

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



Estimulación del sistema incretina en el
remodelado cardiaco inducido por diabetes tipo 2
e isquemia/reperfusión experimentales

María Belén Picatoste Botija

Tesis Doctoral

Madrid, 2015

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

MARÍA BELÉN PICATOSTE BOTIJA
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

DIRECTORES:

Dr. Óscar Lorenzo González y Dr. José Tuñón Fernández

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS -FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ,
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Don Óscar Lorenzo González, Profesor Contratado Doctor de Medicina en la Universidad Autónoma de Madrid, y Don José Tuñón Fernández, Profesor Asociado de Medicina en la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN

Que Doña Belén Picatoste Botija, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Estimulación del sistema incretina en el remodelado cardiaco inducido por diabetes tipo 2 e isquemia/reperfusión experimentales” que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 23 de Diciembre de 2014:

Los Directores de Tesis:

Dr. Óscar Lorenzo González

Dr. José Tuñón Fernández

El Tutor de Tesis:

Dr. Óscar Lorenzo González

Resumen

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en el mundo actual. Estudios clínicos y experimentales han demostrado que la diabetes *per se*, independientemente de otras patologías cardiovasculares asociadas, puede inducir un daño crónico en el miocardio. Esta nueva entidad recibe el nombre de miocardiopatía diabética y está caracterizada por alteraciones moleculares de origen metabólico y eventos de apoptosis, hipertrofia y fibrosis, que tienen como consecuencia la aparición de disfunción diastólica y sistólica, que pueden dar lugar a episodios de insuficiencia cardíaca e infarto agudo de miocardio. Sin embargo, los mecanismos intracelulares involucrados no están completamente descritos, lo que conlleva la ausencia de un tratamiento específico. Además, a pesar de los avances significativos en la terapia médica y las mejoras en la prevención primaria y secundaria de la enfermedad arterial coronaria, el infarto agudo de miocardio continúa siendo la principal causa de muerte en estos pacientes y a nivel global. La reperfusión precoz del miocardio infartado, bien por intervención percutánea coronaria o bien por trombolisis, es la terapia actual efectiva para reducir el tamaño del infarto, preservar la función sistólica del ventrículo izquierdo y reducir la morbilidad y mortalidad cardiovascular en los pacientes. Mientras que el tamaño de infarto es un importante predictor de mortalidad, la insuficiencia cardíaca y el remodelado deletéreo del ventrículo izquierdo son determinantes del pronóstico de la función cardíaca y eventos cardiovasculares futuros. Fármacos basados en la estimulación del sistema incretina como los inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4, y los agonistas de GLP-1, son una nueva clase de drogas antidiabéticas que podrían ejercer una acción dual sobre la sensibilidad a insulina y directamente sobre la célula cardíaca.

En un modelo experimental de miocardiopatía diabética, las ratas diabéticas tipo-2 presentaron hiperglucemia, hiperlipemia, resistencia a insulina, disfunción cardíaca, remodelado (hipertrofia y fibrosis) y apoptosis miocárdica. El tratamiento con sitagliptina, un inhibidor de la DPP-4, mejoró el control glucémico y el perfil lipídico mediante el aumento de GLP-1 endógeno y el consiguiente incremento de los niveles de insulina. Además, mejoró la función cardíaca y redujo los niveles de expresión de moléculas profibróticas, hipertróficas y apoptóticas. En particular, en miocitos y fibroblastos cardíacos en cultivo, altas concentraciones de glucosa o de ácido palmítico estimularon la expresión de moléculas profibróticas, proceso que fue revertido con el pretratamiento con GLP-1 exógeno. Este efecto podría estar mediado por la activación de PPAR β/δ , receptor nuclear de ácidos grasos que actúa como factor de transcripción y que podría controlar la expresión de genes profibróticos como fibronectina. Por otra parte, el metabolito mayoritario de la degradación de GLP-1, GLP-1(9-36), produjo similares efectos antifibróticos que GLP-1 lo que podría reforzar el efecto insulino-independiente del sistema incretina sobre el corazón. Por otro lado, el tratamiento con un agonista del receptor de GLP-1 en un modelo experimental de daño por isquemia/reperfusión en cerdo presentó efectos cardioprotectores reduciendo el tamaño de infarto y mejorando la función sistólica del ventrículo izquierdo. Este tratamiento redujo el remodelado cardíaco medido por la presencia de hipertrofia cardíaca y celular compensatoria, y fibrosis intersticial. Estos datos sugieren que la inducción del sistema incretina podría reducir el daño miocárdico tanto a nivel crónico en la miocardiopatía diabética como en eventos agudos como el infarto agudo de miocardio.

Summary

Cardiovascular diseases are currently the leading causes of death in the world. Experimental and clinical studies have demonstrated the existence of heart failure in diabetic patients independently of any vascular disease or hypertension. Diabetic cardiomyopathy is characterized by molecular alterations due to metabolic changes and events of apoptosis, hypertrophy and fibrosis, which can lead to heart dysfunction and failure and acute myocardial infarction. However, the intracellular mechanisms involved are not fully described, which entails the absence of specific treatment. Moreover, despite the significant advances in medical therapy and improvements in primary and secondary prevention of coronary artery disease, acute myocardial infarction remains the leading cause of death in these patients. Early reperfusion of infarcted myocardium by either percutaneous coronary intervention or thrombolysis are effective in reducing infarct size, preserving left ventricular systolic function and reducing cardiovascular morbidity and mortality. However, ischemia/reperfusion leads to myocardial remodeling which includes deleterious responses like apoptosis and fibrosis. These events will be determinants of heart function and future cardiovascular events. Drugs based on incretin system stimulation, inhibitors of dipeptidyl peptidase-4 and GLP-1 agonists, are a new class of antidiabetic drugs that could exert a dual action, raising insulin sensitivity and also directly affecting the cardiac cell.

In an experimental model of diabetic cardiomyopathy, type-2 diabetic rats showed hyperglycemia, hyperlipidemia, insulin resistance, cardiac dysfunction, remodeling (hypertrophy and fibrosis) and myocardial apoptosis. Treatment with sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, controlled glycemia and lipidemia through the stabilization of endogenous GLP-1 and increasing insulin levels. In addition, it improved cardiac function and reduced levels of expression of fibrotic, hypertrophic and apoptotic molecules. During *in vitro* studies with cardiac myocytes and fibroblasts, high concentrations of glucose or palmitic acid increased the expression of profibrotic molecules. This effect was reversed by the pretreatment with exogenous GLP-1, and likely mediated by PPAR β/δ activation, a fatty acid nuclear receptor that acts as a transcription factor and could control the expression of profibrotic genes such as fibronectin. Moreover, the major metabolite of GLP-1, GLP-1 (9-36), produced similar antifibrotic effects to those of GLP-1, which might reinforce the insulin-independent effect of the incretin system on the heart. In this regard, treatment with a GLP-1 receptor agonist, exenatide, significantly reduced the infarct size in an experimental model of ischemia/reperfusion injury in pigs. Furthermore, this drug reduced cardiac remodeling measured by cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis, and improved left ventricle systolic and mechanical function at one week and one month after myocardial infarction.

These data suggest that the stimulation of the incretin system could reduce diabetic cardiomyopathy and ischemia/reperfusion associated cardiac damage.

Índice

RESUMEN	9
ABREVIATURAS	19
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. Diabetes y enfermedad cardiovascular	25
1.2. Alteraciones funcionales en la Miocardiopatía Diabética y en el Infarto Agudo de Miocardio	26
1. 2. 1. Alteraciones tisulares y moleculares en la Miocardiopatía Diabética	28
1.2.1.1. Glucotoxicidad	28
1.2.1.2. Lipotoxicidad y esteatosis	29
1.2.1.3. Estrés oxidativo e Inflamación	30
1.2.1.4. Muerte celular	31
1.2.1.5. Fibrosis	32
1.2.1.6. Hipertrofia	34
1.2.2. Alteraciones tisulares y moleculares en el daño por Isquemia/Reperusión	35
1.2.2.1. Alteraciones metabólicas	35
1.2.2.2. Estrés oxidativo e Inflamación	35
1.2.2.3. Muerte celular	36
1.2.2.4. Fibrosis	37
1.2.2.5. Hipertrofia	37
1.3. Terapias actuales para el tratamiento de la Miocardiopatía Diabética	38
1.4. Terapias actuales para el tratamiento del Infarto Agudo de Miocardio	39
1.5. Potenciales terapias para el tratamiento de la Miocardiopatía Diabética y del Infarto Agudo de Miocardio	39
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
3. MATERIAL Y MÉTODOS	49
3.1 Modelos experimentales	51
3.1.1. Modelo experimental de Miocardiopatía Diabética en ratas DM1	51
3.1.2. Modelo animal de Miocardiopatía Diabética en ratas Goto Kakizaki	52
3.1.3. Modelo animal de Isquemia/Reperusión en cerdo	53
3.2. Técnicas de Imagen para la determinación de la anatomía y funcionalidad del corazón	55
3.2.1. Ecocardiografía	55
3.2.2. Resonancia Magnética	56
3.3. Sacrificio y extracción de muestras	57

3.4. Test de tolerancia a la glucosa	58
3.5. Cultivos celulares	58
3.6. ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)	59
3.7. Estudios morfológicos e inmunohistoquímicos	59
3.7.1. Inmunohistoquímica dirigida	60
3.7.2. Inmunofluorescencia tisular y celular	60
3.7.3. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling)	61
3.8. Análisis proteico	61
3.8.1. Western Blot	61
3.8.2. Ensayo de actividad de unión al ADN (EMSA)	62
3.8.3. Análisis proteómico y predicción de rutas moleculares	63
3.9. Análisis genético. Transcripción inversa y PCR a tiempo real	64
3. 10. Análisis estadístico	65
4. RESULTADOS	67
4.1. RESULTADOS 1: La Diabetes tipo-1 experimental induce alteración de proteínas cardíacas implicadas en apoptosis, hipertrofia, fibrosis y, fundamentalmente, en el metabolismo	69
4.1.1. La Diabetes tipo-1 crónica induce fibrosis en el miocardio	69
4.1.2. La STZ-DM1 crónica produce apoptosis celular cardíaca	71
4.1.3. Expresión proteica diferencial en el miocardio STZ-DM1	72
4. 2. RESULTADOS 2: La sitagliptina reduce la apoptosis, hipertrofia y fibrosis cardíaca en diabetes tipo-2 experimental, mayoritariamente a través de mecanismos dependientes de insulina. Potencial papel de las isoformas de GLP-1	75
4.2.1. La sitagliptina y la metformina disminuyeron la hiperglucemia y la hiperlipemia en ratas GK	75
4.2.2. La sitagliptina disminuyó el grosor de las paredes del VI y la hipertrofia celular en el miocardio GK	76
4.2.3. El tratamiento con sitagliptina redujo la fibrosis y la hipertrofia del VI en ratas GK	77
4.2.4. La sitagliptina y la metformina disminuyeron la muerte celular del VI en ratas GK	79
4.2.5. La sitagliptina aumentó los niveles de GLP-1 en plasma de ratas GK tanto en ayuno como tras sobrecarga de glucosa	80
4.2.6. Expresión del receptor celular para GLP-1	81
4.2.7. GLP-1 regula la fibrosis, hipertrofia y apoptosis inducidas por HF y/o HG en cardiomiocitos en cultivo	81
4.2.8. El péptido GLP-1(9-36) presentó similares efectos cardioprotectores que GLP-1	85
4.2.9. PPAR β/δ como mediador del efecto antifibrótico de GLP-1	86
4.2.10. Efectos protectores directos de la metformina en células cardíacas	86
4.3. RESULTADOS 3: Papel cardioprotector de un agonista de GLP-1R en un modelo experimental de isquemia/reperfusión	89

4.3.1. Exenatida redujo el tamaño de infarto y mejoró la recuperación de miocardio	89
4.3.2. Evaluación de la función cardíaca por ecocardiografía	90
4.3.3. La exenatida redujo el remodelado del ventrículo izquierdo	91
4.3.4. Exenatida redujo la hipertrofia celular y la activación de Akt y ERK1/2	92
4.3.5. Exenatida disminuyó la fibrosis intersticial principalmente en la zona borde del área infartada	94
5. DISCUSIÓN	97
5. 1. La STZ-DM1 crónica estimula procesos de apoptosis, fibrosis e hipertrofia y, principalmente, alteraciones metabólicas en el miocardio	99
5. 2. La estimulación del sistema incretina podría atenuar efectos adversos de la Miocardiopatía Diabética y del daño por Isquemia/Reperfusión	102
5.2.1. La sitagliptina reduce el remodelado cardíaco en DM2 experimental. Potencial papel mediador de PPAR β/δ	102
5.2.2. La exenatida podría disminuir el tamaño de infarto y el remodelado cardíaco en un modelo de IAM	106
6. CONCLUSIONES	111
7. BIBLIOGRAFÍA	115
8. ANEXO A	131
9. ANEXO B	137

Abreviaturas

A continuación se detallan todos los acrónimos y abreviaturas utilizados a lo largo de esta tesis. En la mayoría de ellos se ha conservado la nomenclatura original en inglés por su amplio uso en el lenguaje científico en cuyo caso se detalla su definición completa en inglés y en castellano.

ACS: Acetil-CoA sintasa.

ACO2: Aconitasa 2 mitocondrial.

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

ADNc: Ácido desoxiribonucleico complementario.

AGEs: Productos finales de glucosilación avanzada / Advanced Glycation Endproducts.

AKT: Poteína quinasa α -serina/treonina / Alpha serin threonin protein kinase.

ANP: Péptido Natriurético Atrial / Atrial Natriuretic Peptide.

ANXA5: Anexina-5.

AP-1: Proteína activadora -.

AT-1: Receptor-1 de Angiotensina.

ATP: Adenosina 5'-trifosfato.

ATP5A1: ATP sintasa / ATP synthase.

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.

Bax: Proteína X asociada a Bcl-2.

Bcl-2: Gen del linfoma de células B- 2 / B- cell lymphoma 2.

CAT: Catalasa.

CKM: Creatina quinasa muscular / Creatine kinase, muscle..

CoA: Coenzima A.

COL: Colágeno.

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo / Connective tissue growth factor.

CV: Cardiovascular.

DAG: Diacilglicerol.

DDVI: Disfunción diastólica del ventrículo izquierdo.

DES: Desmina.

DIGE: Electroforesis diferencial en gel / Difference gel electrophoresis.

DLST: Dihidrolipoamida S-Succiniltransferasa.

DM: *Diabetes mellitus*.

Abreviaturas

DPP-4: Dipeptidil peptidasa-4 / Dipeptidil peptidase-4.

ENO-1: Enolasa 1.

ERK: Quinasa regulada extracelularmente / Extracellular regulated kinase.

FA: Ácido graso / Fatty acid.

FABP: Proteína de unión a ácidos grasos / Fatty acid binding protein.

FADD: Proteína asociada a Fas con dominio de muerte / Fas-associated death domain protein.

FasL: Ligando de Fas.

FAT/CD36: Translocasa de ácidos grasos-grupo de diferenciación 36 / Fatty acid translocase-Cluster of Differentiation 36

FATP: Proteína transportadora de ácidos grasos / Fatty acid transport protein.

FDA: Administración de alimentos y fármacos / Food and Drug Administration.

FEVI: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

FN: Fibronectina.

GK: Goto-Kakizaki.

GLP-1: Péptido-1 similar al glucagón / Glucagon like peptide-1.

GLP-1R: Receptor para el péptido-1 similar al glucagón / Glucagon like peptide-1 receptor.

GLUT-4: Transportador de glucosa 4 / Glucose transporter 4.

HbA_{1c}: Hemoglobina glicosilada.

HDL: Lipoproteína de alta densidad / High density lipoprotein.

HF: Alta concentración de ácidos grasos / High fatty acid

HG: Alta concentración de glucosa / High glucose.

HSP: Proteína de choque térmico / Heat shock protein.

IAM: Infarto agudo de miocardio / Myocardial infarction.

ICAM: Molécula de adhesión intracelular / Intracellular Adhesion Molecule.

IDH3A: Isocitrato deshidrogenasa-3 / Isocitrate deshydrogenase-3.

IL: Interleuquina.

JNK: Quinasa n-terminal de Jun / c-Jun N-terminal kinase.

ADA: Arteria coronaria descendente anterior.

LDB3: Proteína de dominio de unión a LIM-3 / LIM domain binding 3- isoform.

LDL: Lipoproteína de baja densidad / Low density lipoprotein.

MCAD: Acetil-CoA deshidrogenasa de cadena media / medium-chain acyl-CoA dehydrogenase.

MCD: Miocardiopatía diabética.

MCP-1: Proteína quimiotáctica para monocitos-1 / Monocyte chemotactic protein-1.

MDH: Malato deshidrogenasa.

MEC: Matriz extracelular.

MMP: Metaloproteínasa de matriz / Matrix metalloproteinase.

MVO₂: Consumo de oxígeno por el miocardio.

NFκB: Factor nuclear kappa B / Nuclear factor kappa B.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa / Polymerase Chain Reaction.

PDK4: Piruvato deshidrogenasa quinasa isoenzima-4 / Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme-4.

PDLIM: Dominio 1PDZ y LIM / PDZ and LIM domain 1.

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa / Phosphatidylinositol-3-kinase.

PKC: Proteína quinasa C.

PKM: Piruvato quinasa muscular / Pyruvate kinase, muscle..

PPAR: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas / Peroxisome proliferator-activated receptors.

RAAS: Sistema renina-angiotensina-aldosterona / Renin-angiotensin-aldosterone system.

RAGEs: Receptor para AGEs / Receptor for AGEs.

RM: Resonancia magnética.

ROS: Especies reactivas de oxígeno / Reactive oxygen species.

RTG: Realce tardío de gadolinio.

RT: Reacción de Transcripción inversa / Reverse Transcription Reaction.

SOD: Superóxido dismutasa.

SPECT: Tomografía computerizada por emisión monofotónica / Single photon emission computed tomography.

SU: Sulfonilurea.

SUCLG1: Succinato-CoA ligasa.

TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

TGFβ: Factor de crecimiento transformante 1 / Transforming Growth Factor beta 1.

TGFβR: Receptor de TGFβ.

TNFα: Factor de necrosis tumoral α / Tumor necrosis factor α.

TRADD: Proteína asociada a TNF con dominio de muerte / TNF-associated death domain protein.

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNFα / TNF- related apoptosis-inducing ligand.

Abreviaturas

TUNEL: Detección de UTP terminal por transferasa deoxinucleotidil terminal / Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

TZD: Tiazinidildiona.

UQCRC1: Ubiquinol-citocromo C reductasa / Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein1..

VCAM: Proteína de adhesión celular vascular / Vascular Cell Adhesion Protein-1.

VI: Ventrículo izquierdo.

1. Introducción

1.1. Diabetes y enfermedad cardiovascular

La *Diabetes Mellitus* (DM) es una enfermedad crónica que se induce por una carencia en la producción de insulina o una ineficiencia en su utilización⁵⁴. Existen dos tipos principales de diabetes: diabetes tipo-1 (DM1) y diabetes tipo-2 (DM2). La DM1 se inicia generalmente por una respuesta autoinmune sobre las células β del páncreas que provoca un daño celular y una deficiencia en la producción de insulina. Determinados factores medioambientales como la dieta en los primeros años de vida o infecciones virales podrían ser responsables del desarrollo de esta enfermedad. No obstante, un 90% de los pacientes diabéticos padecen DM2. A diferencia de la DM1, las personas con DM2 sí producen insulina, al menos en estadios iniciales, pero una carencia en la sensibilidad a insulina provoca que la utilización de la glucosa por los tejidos no sea óptima. Diversos factores de riesgo participan en el desarrollo de DM2. La modificación de los hábitos alimenticios, estilo de vida, obesidad, inactividad física, edad avanzada, antecedentes familiares de DM e hiperglucemia gestacional son algunos de ellos⁶¹. La prevalencia global de DM2 se ha incrementado de tal manera que está alcanzando proporciones epidémicas. Los datos más recientes de la Federación Internacional de Diabetes indican que el 8,3% de los adultos - 382 millones de personas- padecen DM en el mundo, y este número se incrementará en más de 592 millones en 25 años (Figura 1). Además, la DM supone un alto gasto sanitario que se predice que alcanzará los 595.000 millones de dólares en 2030³⁸.

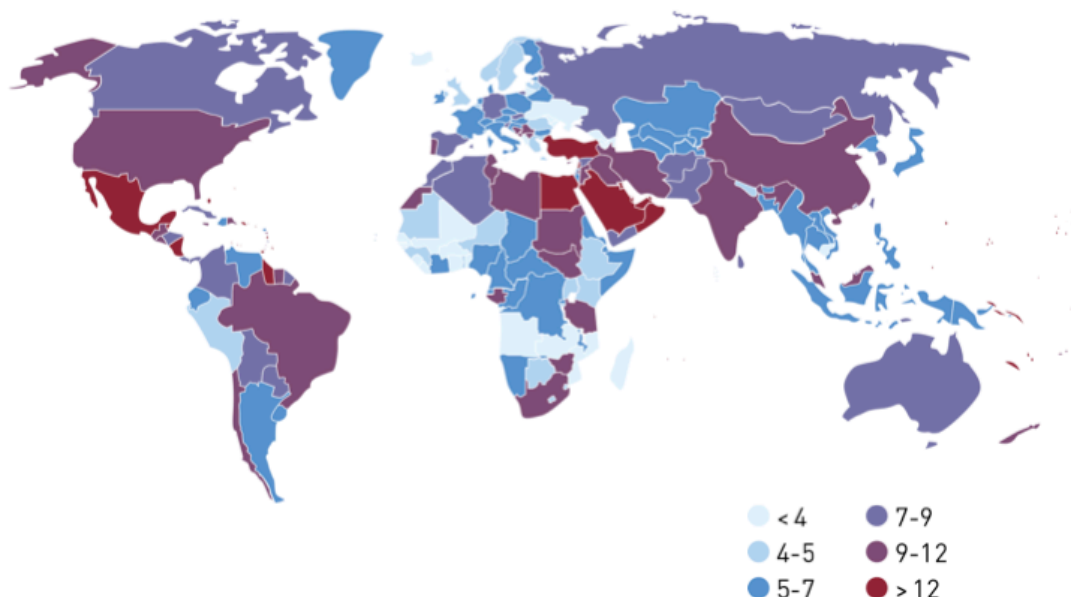


Figura 1. Prevalencia mundial (%) de DM en adultos (20-79 años). El 80% de las personas diabéticas viven en países con ingresos medios o bajos. Federación Internacional de Diabetes, Atlas de diabetes, 2013³⁸

En España, la prevalencia de DM es del 12%. Además se estima que cerca de la mitad de la población diabética no sabe que padece esta patología³⁸. Por otra parte existen personas que, a pesar de no presentar niveles de glucosa en sangre propios de pacientes con DM, presentan una glucemia elevada con respecto a valores normales. Se trata de un estado de prediabetes que también predispone al paciente a padecer complicaciones cardiovasculares. La enfermedad cardíaca es la principal causa de muerte (50-70%) entre los pacientes diabéticos¹²³ y la DM, la mayor comorbilidad entre los pacientes con fallo cardíaco y con eventos adversos de la enfermedad cardiovascular (ECV)¹⁰. Las ECV más frecuentes entre los pacientes con DM son el infarto agudo de miocardio (IAM), la angina de pecho, la enfermedad arterial periférica y la insuficiencia cardíaca congestiva. Estos pacientes presentan complicaciones crónicas microvasculares (retinopatía, nefropatía, neuropatía periférica o autonómica y alteraciones odontológicas) y macrovasculares (enfermedad coronaria, cardiopatía isquémica, ictus y arteriopatía periférica). Además, la hipertensión arterial, hiperlipemia y otros factores de riesgo frecuentes como la obesidad o el sobrepeso, contribuyen al aumento del riesgo de complicaciones CV. Sin embargo, en 1972 Rubler y colaboradores describieron por primera vez el fallo cardíaco en cuatro pacientes diabéticos sin alteración vascular alguna¹¹⁷. Se definió entonces la miocardiopatía diabética (MCD) como la disfunción ventricular que ocurre en el paciente diabético, independientemente de la patología vascular, hipertensión u otra cardiopatía¹². A partir de entonces, el conocimiento sobre los cambios que se producen durante la MCD ha ido creciendo.

La ECV es la primera causa de muerte en los países desarrollados y la segunda causa de mortalidad hospitalaria^{114, 158}. El término IAM hace referencia al daño tisular producido por la falta de riego sanguíneo en una determinada zona del corazón, cuya condición subyacente es, en la mayoría de los casos, la ruptura de una placa aterosclerótica. El ambiente isquémico en esta zona desencadena la activación de mecanismos celulares y moleculares y alteraciones en la contracción-relajación del miocardio que desencadena frecuentemente arritmias ventriculares. Además, el remodelado cardíaco origina disfunción sistólica crónica siendo ambos importantes predictores de futuros eventos. Concretamente, el reingreso tras un IAM es frecuente y ocurre en un 8-20% durante el primer año.

1.2. Alteraciones funcionales en la Miocardiopatía Diabética y en el Infarto Agudo de Miocardio

La consecuencia de los cambios moleculares y estructurales del miocardio diabético es la alteración de su función, que comienza en estadios iniciales principalmente con una función diastólica reducida y, en fases posteriores, con afectación de la función sistólica. La

fisiopatología de la disfunción diastólica se caracteriza por el retraso en la relajación miocárdica, deterioro del llenado ventricular izquierdo y aumento de la rigidez ventricular. Estas condiciones provocan un incremento de la presión telediastólica del ventrículo izquierdo (VI) y de la presión capilar pulmonar lo que se traduce en congestión pulmonar. La disfunción diastólica del VI puede llegar a estar presente en algunas series hasta en un 50% de los pacientes asintomáticos¹¹⁵. Esta disfunción se ha demostrado también en modelos animales⁹³. La insuficiencia cardiaca por disfunción sistólica, sin embargo, está caracterizada por insuficiencia cardiaca en el contexto de una enfermedad estructural cardiaca que provoca una disminución de la función contráctil del VI. La reducción de la eficacia sistólica es el resultado de una hipertrofia concéntrica y el aumento de la masa del VI³⁰. La técnica utilizada habitualmente para la medida de la función ventricular es la ecocardiografía en dos dimensiones (2D). Sin embargo, existen otras técnicas que permiten la detección de las anormalidades precoces, incluso antes de poder observar una disfunción cardiaca. La ecocardiografía tridimensional (3D), por ejemplo, determina los volúmenes de forma más precisa, puesto que no se basa en presunciones geométricas del ventrículo. La resonancia magnética (RM) es una técnica fiable y reproducible con alta resolución espacial y temporal. Sin embargo, esta técnica es más costosa y no está disponible en todos los casos. Existen otras técnicas menos usadas y la decisión del uso de una técnica u otra dependerá del ámbito clínico o del contexto del estudio de investigación¹²⁰.

En el IAM, los mecanismos deletéreos producidos durante la isquemia miocárdica son inducidos por la falta de oxígeno, nutrientes y factores de supervivencia celulares, y por la acumulación de productos de deshecho¹¹². El daño miocárdico puede ser letal o subletal dependiendo de la duración y la severidad del periodo de isquemia. Además, cuando se restablece la circulación en la zona isquémica, se desencadenan otros procesos deletéreos que también producen daño miocárdico. Concretamente se desarrolla un remodelado cardiaco deletéreo¹¹³ que incrementa el riesgo de padecer arritmias, fallo cardiaco o incluso de muerte y que depende del tamaño y de la severidad del IAM^{124,124}. El corazón es capaz de adaptarse a la patofisiología del IAM con modificaciones estructurales y funcionales que se conocen globalmente como remodelado cardiaco. Una de las adaptaciones más importantes es la hipertrofia del miocardio remoto no infartado para intentar compensar la función sistólica del ventrículo izquierdo (FSVI) perdida durante el IAM. Asimismo, se produce una dilatación del VI para mantener el volumen por latido adecuado a las necesidades del miocardio. Finalmente, y debido al aumento del estrés en la pared ventricular, se produce la aparición de fibrosis intersticial en el tejido remoto. Todas estas adaptaciones, que inicialmente son beneficiosas para mantener la función cardiaca a corto plazo, si se prolongan crónicamente en el tiempo, acaban resultando deletéreas. De hecho,

la hipertrofia celular mantenida se considera un proceso deletéreo asociado con arritmias, muerte súbita e insuficiencia cardiaca^{46,125}.

1. 2. 1. Alteraciones tisulares y moleculares en la Miocardiopatía Diabética

Las condiciones metabólicas presentes en la DM como la hiperglucemia, la hiperlipidemia y la resistencia a la insulina dañan tejidos periféricos como el corazón induciendo estrés oxidativo y fenómenos de inflamación, esteatosis, apoptosis y fibrosis lo que conlleva la progresión de la disfunción cardiaca.

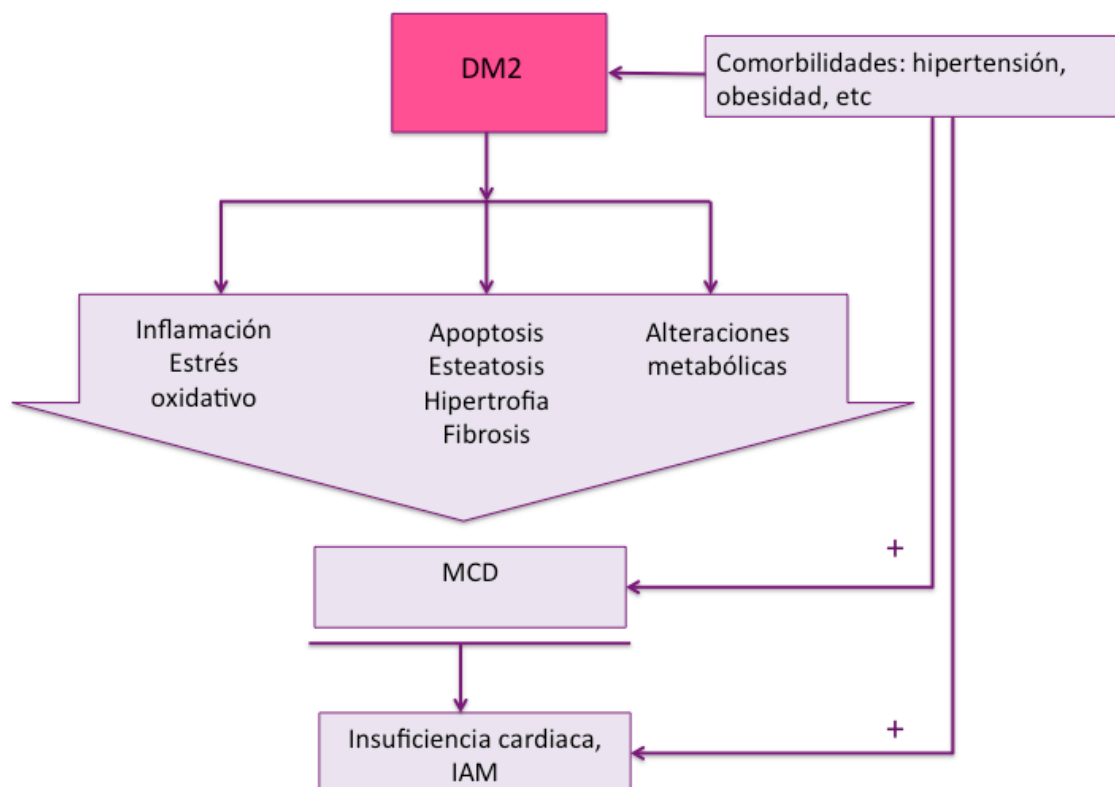


Figura 2. Mecanismos implicados en la MCD. Durante el desarrollo de la DM se produce hiperglucemia e hiperlipemia que provocan alteraciones metabólicas en el corazón y eventos de apoptosis, esteatosis, hipertrofia y fibrosis, así como un aumento de estrés oxidativo e inflamación. Estos procesos pueden conducir a insuficiencia cardiaca e IAM. Además existen comorbilidades que acompañan y agravan estos procesos, facilitando el desarrollo de insuficiencia cardiaca e IAM.

1.2.1.1. Glucotoxicidad

En condiciones fisiológicas, los niveles de insulina determinan la captación óptima de glucosa por las células cardiacas. Sin embargo, bien por su carencia o bien por su ineficacia, se produce una disminución de la expresión y translocación de GLUT-4, el principal

transportador de glucosa en el miocardio. Esto causa la disminución de la entrada de glucosa así como de su oxidación por glucólisis^{48,9}. Además, los niveles elevados de glucosa circulantes producen un aumento en los niveles intracelulares de diacilglicérido (DAG), que activa la proteína quinasa C (PKC), enzima que contribuye a la patología de la DM2 reduciendo aún más la señal de insulina. Además, las altas concentraciones de glucosa dan lugar a la estimulación de TGF β como principal inductor del remodelado cardiaco. La glucosa en exceso también puede desviarse a la vía del poliol o sorbitol en la cual se obtiene fructosa a partir de glucosa y sorbitol. Esto reduce la producción de NADPH y glutatión¹³⁵. La glucosa puede además glicar proteínas plasmáticas y tisulares, lípidos y ácidos nucleicos, modificando su estructura, sus propiedades físico-químicas y sus funciones biológicas, dando lugar finalmente a productos finales de glicación de la glucosa (AGEs)^{11,16}. Recientemente se ha observado que los AGEs y sus receptores celulares (RAGEs) juegan un papel adicional importante en la patogénesis de la MCD promoviendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de rutas de señalización de la proteína activada por mitógenos (MAPK) y de NF- κ B, el cual es capaz de sobreexpresar factores proinflamatorios y profibróticos como moléculas de adhesión (VCAM-1 y ICAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) e inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1).

1.2.1.2. Lipotoxicidad y esteatosis

En el corazón adulto sano, el 60-90% del ATP se produce principalmente a través de la oxidación de ácidos grasos (FAs), con una menor utilización de glucosa y de lactato¹²⁸. Sin embargo, cuando se produce un daño en el corazón, el metabolismo cardiaco se desvía hacia la utilización de glucosa como fuente principal de energía^{15, 87}. En el corazón, los ácidos grasos son transportados al citosol por receptores específicos como FAT/CD36, FATP/FABP o por difusión al citosol e inmediatamente convertidos a acil-graso-CoA para ser interiorizados a las mitocondrias por carnitil-palmitoil-transferasas (CPT). Allí son degradados por β -oxidación y entran en el ciclo de Krebs para sintetizar ATP. Uno de los mecanismos por los que la DM2 causa disfunción cardiaca están relacionados con la acumulación de lípidos y derivados lipotóxicos (DAG, fosfolípidos oxidados o ceramidas) en el miocardio. Además, los FAs son capaces de regular el metabolismo de la glucosa ya que reducen su transporte mediado por insulina e inhiben la glucólisis y la oxidación de piruvato. Esta relación se definió en 1963 por Randle y colaboradores como Efecto Randle, haciendo referencia a una relación dinámica entre los FAs y la glucosa, compitiendo entre ellos por su oxidación¹⁰⁹.

Los receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPAR), son factores de

transcripción nuclear que forman un heterodímero con el receptor retinoico (RXR) y pueden unirse a los elementos de respuesta de los genes diana^{53,19}. Esta unión puede dar lugar a la estimulación o a la represión de genes uniéndose a las regiones promotoras e interactuando con cofactores estimuladores o represores. Dado el papel regulatorio de los PPARs en el control del metabolismo de lípidos y de glucosa, su participación en la modulación y control de la homeostasis energética del miocardio es importante. Los ligandos naturales de los PPARs son los ácidos grasos poliinsaturados y algunos eicosanoides. Se han descrito 3 isoformas en el corazón: α (NR1C1), β/δ (NR1C2) y γ (NR1C3), esta última con escasa presencia en el miocardio. PPAR α está implicado en la regulación de genes de prácticamente cada etapa del metabolismo lipídico cardiaco incluyendo su transporte, movilización y catabolismo. Los ratones deficientes en PPAR α presentan una disminución de genes implicados en estos procesos como FAT/CD36, CPT o acetil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD)^{146,18}. Sin embargo, la sobreexpresión de esta isoforma da lugar a un fenotipo MCD por el aumento de genes involucrados en la utilización de FAs y, a su vez, a la disminución de la oxidación de glucosa debido a la inhibición de la piruvato deshidrogenasa (PDH). Además, en esta situación disminuye la expresión de GLUT-4. PPAR β/δ es una isoforma presente en el tejido miocárdico y se ha postulado que podría estar involucrada en el desarrollo de la MCD. PPAR β/δ activa la transcripción de genes como PDK4 o FAT/CD36, mejora la sensibilidad a la insulina y reduce los niveles de lípidos sanguíneos induciendo genes relacionados con el almacenamiento de lípidos y la termogénesis¹²⁹. PPAR γ es un importante regulador del transporte y síntesis de ácidos grasos¹⁵⁴ y ejerce su acción sobre el corazón fundamentalmente por su efecto en otros órganos. Sin embargo se ha observado que su activación ejerce efectos beneficiosos en la viabilidad de células cardíacas¹³⁰

1.2.1.3. Estrés oxidativo e Inflamación

El aumento de la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) inducido por el exceso de glucosa y FAs activa diferentes vías que contribuyen a la patofisiología de la MCD¹². El estrés oxidativo es el resultado del desequilibrio entre la actividad antioxidante y la producción de ROS. Las principales moléculas ROS son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aniones oxígeno (O_2^-) y radicales hidroxilos (OH^\cdot) y superóxidos ($O_2^{\cdot-}$). Además, el $O_2^{\cdot-}$ puede combinarse de forma espontánea con radicales NO^\cdot producidos por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) para formar peroxinitrito ($ONOO^\cdot$)¹³⁸. En el corazón, la formación de ROS puede ser citosólica y principalmente mitocondrial. Los principales mecanismos de daño de las ROS son: la peroxidación de lípidos, la oxidación de las proteínas y la rotura del ADN. Por otro lado existen moléculas como la superóxido dismutasa (SOD), la hemooxigenasa (HO-1),

la glutatión peroxidasa (GPox) o la catalasa, además de otras especies no enzimáticas como la transferrina, ferritina o las vitaminas A, C y E que actúan como antioxidantes⁴⁰. Además, el estrés oxidativo produce cambios importantes en el funcionamiento del retículo endoplásmico. Este orgánulo es responsable del ensamblaje y modificación de proteínas. El aumento del estrés oxidativo da lugar a la acumulación de proteínas sin ensamblar en el retículo, lo que estimula el proceso de apoptosis celular^{75,153}. El daño mitocondrial por exceso de ROS induce la desestabilización de la membrana y del potencial osmótico, la sobrecarga de Ca^{2+} y la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP).

El exceso de ROS, el daño mitocondrial y de retículo endoplásmico, así como la muerte celular, inducen la expresión de moléculas proinflamatorias e inflamación en la MCD. La respuesta inflamatoria es un evento temprano en el desarrollo de la MCD y en la progresión del fallo cardíaco^{4,149}. En diversos estudios se ha demostrado un aumento de moléculas de adhesión celular como ICAM-1 o VCAM-1, macrófagos, leucocitos y citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α y TGF β)^{149,148,4}. NF- κ B es uno de los reguladores más importantes de la expresión de genes proinflamatorios. En modelos experimentales de MCD temprana, la activación de NF- κ B se correlaciona con un incremento de la expresión de IL-1 β y del factor de necrosis tumoral TNF α ^{4,148}. Nosotros observamos en un modelo de DM1 inducido por STZ, un aumento de citoquinas inflamatorias cardíacas en estadios iniciales de MCD⁴.

1.2.1.4. Muerte celular

En estudios de DM en humanos y en modelos experimentales se han detectado altos niveles de muerte celular en miocitos, células endoteliales y fibroblastos cardíacos. El ambiente lipotóxico, la producción excesiva de ROS, las alteraciones en la estructura y función de la mitocondria y el elevado estrés del retículo endoplásmico son los principales responsables de la muerte de células cardíacas^{76,103}. Necrosis y apoptosis poseen tipologías morfológicas y dinámicas distintas. La primera se caracteriza por un aumento de volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y salida del material intracelular debido a la desnaturalización de proteínas, a la digestión enzimática, a la condensación ligera de cromatina y a la formación de núcleos picnóticos. La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que se caracteriza por condensación y fragmentación de la cromatina nuclear y formación de vacuolas en el citosol. Este proceso implica la activación de enzimas proteolíticas endocelulares con gasto energético y formación de oligofragmentos de ADN, denominados cuerpos apoptóticos, los cuales son expulsados de la célula por exocitosis. La apoptosis puede estar inducida principalmente por dos vías, extrínseca e intrínseca, ambas descritas en la MCD. La vía extrínseca se inicia por estímulos extracelulares como el ligando

de Fas (Fas-L), $\text{TNF}\alpha$ o el ligando inductor de apoptosis relacionado con $\text{TNF}\alpha$ (TRAIL) que se unen a sus receptores celulares, Fas, TNF-R y TRAIL-R respectivamente, asociados a mediadores con secuencias de dominios de muerte, FADD y TRADD (proteína asociada a Fas y proteína asociada a TNF-R con dominios de muerte). Una vez que se activan estos mediadores, se inicia la conversión de procaspasa-8 a caspasa-8, la cual induce la activación de caspasas efectoras como la caspasa-3 que estimulan las endonucleasas y proteasas. En la vía intrínseca la mitocondria es el orgánulo promotor. Proteínas de la familia de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), tanto apoptóticas como antiapoptóticas, están reguladas en la enfermedad cardíaca²³. Las proteínas proapoptóticas, especialmente Bax, provocan la liberación de citocromo C al citosol, activan la proteasa APAF-1 y abren el mPTP. Otras proteínas de la familia Bcl-2, sin embargo, preservan la actividad mitocondrial. El balance entre las proteínas pro y antiapoptóticas determina el destino de la célula³².

1.2.1.5. Fibrosis

La pérdida celular en el miocardio diabético puede dar lugar a un remodelado cardíaco como mecanismo de adaptación para reemplazar los espacios libres con células y tejido intersticial. Los fibroblastos son las principales células productoras de matriz extracelular (MEC). Sin embargo, los cardiomiocitos también son capaces de producir factores que participan en este proceso. La MEC cardíaca está integrada principalmente por colágeno fibrilar y no fibrilar, fibronectina, así como laminina y elastina, proteoglicanos e integrinas⁵⁰. La fibronectina es una glicoproteína adhesiva presente en forma soluble en el plasma e insoluble en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos y constituye otro de los componentes mayoritarios. Entre sus principales funciones está la de intervenir en la remodelación de los tejidos durante la embriogénesis y participar en el proceso de cicatrización vascular tras una lesión.

La MEC es importante para la conservación de la estructura del corazón. Sin embargo, en condiciones de DM, el exceso de MEC producida por un desequilibrio entre la producción y la degradación de sus componentes modifica la estructura del miocardio dificultando su capacidad de contracción. Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) juegan un papel importante en la regulación de la MEC ya que participan en la degradación de sus componentes. Estas enzimas, por otro lado, pueden ser inactivadas a su vez por inhibidores de MMPs (TIMPs).

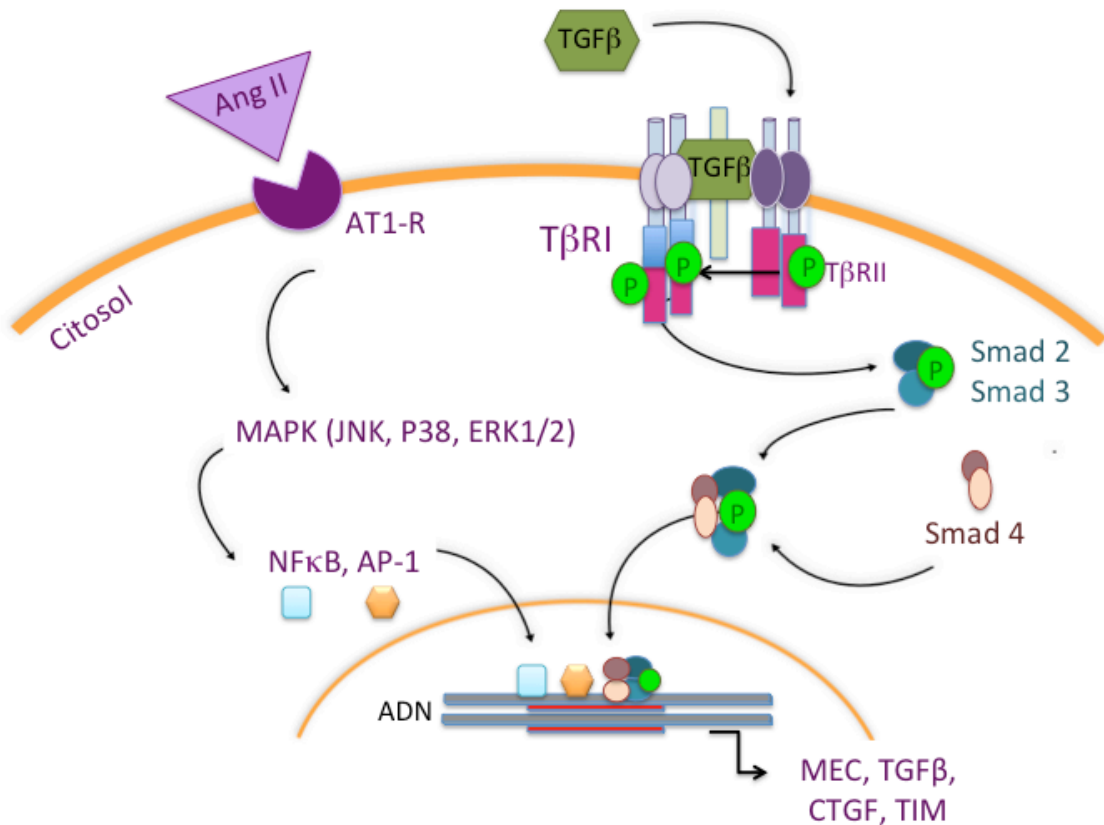


Figura 3. Principales vías de señalización de fibrosis en la célula cardíaca. Ang II y TGFβ actúan a través de sus receptores AT1-R y TGFβ-R, respectivamente, estimulando vías de señalización que promueven la activación de factores de transcripción tales como NFκB o AP-1 y que inducen la transcripción de genes profibróticos. La unión del ligando TGFβ con el TGFβR-II conlleva la fosforilación y activación del TGFβR-I que fosforila a proteínas Smad que se translocan al núcleo y estimulan la transcripción de determinados genes profibróticos⁸⁵.

A diferencia de la fibrosis reparativa que reemplaza los cardiomiocitos desaparecidos por necrosis o apoptosis, la fibrosis de remodelado o reactiva en MCD ocurre normalmente como resultado de cambios mecánicos o bioquímicos locales. En la MCD el acúmulo de MEC puede dar lugar a insuficiencia cardíaca ya que compromete tanto la función sistólica como la diastólica del corazón¹⁴⁷. En este sentido, existen dos vías principales reguladoras de la producción de MEC (Figura 3). El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) está implicado en el control de la producción y degradación de MEC. La angiotensina II (Ang II) local a través de su receptor AT1-R estimula vías de señalización que promueven la activación de factores de transcripción como AP-1 o NFκB que inducen la transcripción de genes de MEC como colágenos, fibronectina y TGFβ (factor de crecimiento transformanteβ), favoreciendo su acumulación⁸¹. Además, la Ang II induce estrés oxidativo y promueve la secreción de citoquinas fibrogénicas e inflamatorias como TNFα y TGFβ. El sistema TGFβ representa otro de los mediadores más importantes del remodelado

miocárdico como respuesta adaptativa a un ambiente hemodinámico sobrecargado y a un ambiente metabólico alterado, estimulando la producción de colágenos y fibronectina. En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que TGF β estimula la producción de MEC a través de sus receptores de superficie celular (TGF β R-I, -II, y -III), mediadores Smads y genes profibróticos como CTGF y proteínas de MEC⁷² (Figura 3).

1.2.1.6. Hipertrofia

La hipertrofia es un proceso clave en el remodelado cardíaco del VI que se produce en la MCD, con independencia de otras patologías como obesidad o hipertensión³⁰ (Figura 4). El tamaño del corazón viene determinado por el volumen de los miocitos puesto que, aunque estos sólo representan un 30% de las células cardíacas, constituyen alrededor del 75% del volumen de este órgano. Durante el crecimiento o la práctica de actividad física intensa, se produce un aumento del tamaño fisiológico que no va acompañado de deposición de MEC ni supone un compromiso funcional. Sin embargo, la hipertrofia patológica suele ir acompañada de fibrosis intersticial, apoptosis, disminución de la irrigación y reprogramación de la expresión génica¹¹⁸.

La hipertrofia cardíaca puede ser excéntrica o concéntrica. La hipertrofia excéntrica se caracteriza por una dilatación de la cavidad ventricular sin producirse un aumento tan grande del grosor de las paredes. Este caso es característico de una situación de sobrecarga de volumen. La hipertrofia concéntrica, sin embargo, se caracteriza por un aumento del grosor de la pared ventricular, sin aumento del diámetro de la cavidad. En este caso se produce una incorporación de sarcómeros fundamentalmente en paralelo y un crecimiento de los miocitos a lo ancho y normalmente se produce en estímulos de sobrecarga de presión crónica. En pacientes MCD se describe habitualmente hipertrofia concéntrica y en ocasiones, hipertrofia excéntrica acompañadas de una sobreexpresión de genes hipertróficos como los péptidos natriuréticos atrial y cerebral (ANP y BNP) o el gen que codifica para la cadena pesada β de la miosina⁷³. En el contexto de la hipertrofia cardíaca, los sistemas RAA y TGF β también juegan un papel importante^{151,51}. En un modelo de prediabetes en ratas GK se observó una relación entre el aumento de la actividad de TGF β y la activación de la ruta prohipertrófica Akt/p70S6k1. TGF β también activa la ruta Akt–mTOR–S6k, reguladora clave de la síntesis proteica^{34, 83}.

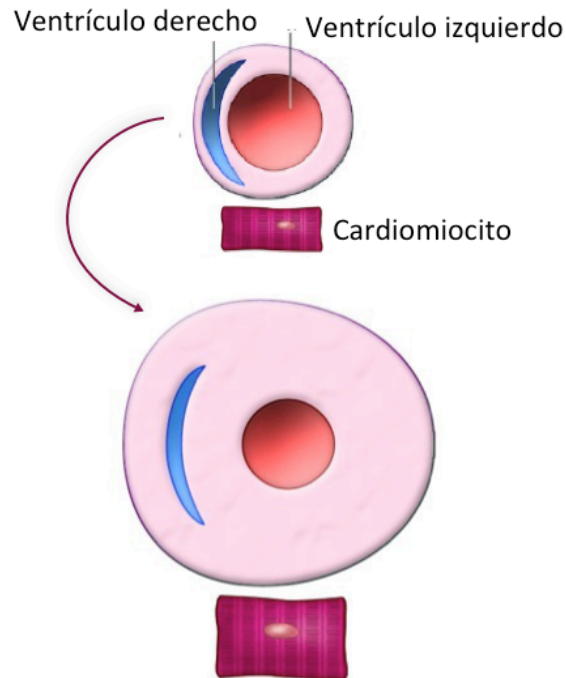


Figura 4. Hipertrofia cardíaca en la MCD. El corazón desarrolla un remodelado caracterizado por el aumento de tamaño de los miocitos a nivel transversal y el consecuente incremento en el grosor de las paredes y disminución de la cavidad ventricular.

1.2.2. Alteraciones tisulares y moleculares en el daño por Isquemia/Reperfusión

1.2.2.1. Alteraciones metabólicas

El bloqueo del paso de oxígeno y suministro de nutrientes como glucosa o FAs a la zona isquémica induce un desplazamiento energético hacia el uso de la glucosa como sustrato más efectivo mediante la estimulación de la translocación de GLUT4^{52,127}. El metabolismo cardíaco en estas condiciones se vuelve cada vez más anaerobio y se produce un aumento de Ca^{2+} intracelular, una disminución del pH y una acumulación de productos de deshecho. En el proceso de reperfusión cardíaca se produce un reajuste en las fuentes energéticas aumentando la utilización de FAs³⁹.

1.2.2.2. Estrés oxidativo e Inflamación

La disminución de pH durante la isquemia altera el funcionamiento de la ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ produciéndose una sobrecarga intracelular de Na^+ que provoca que el intercambiador $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ funcione en sentido opuesto para expulsar al exterior celular el exceso de Na^+ , induciendo la entrada masiva de Ca^{2+} .

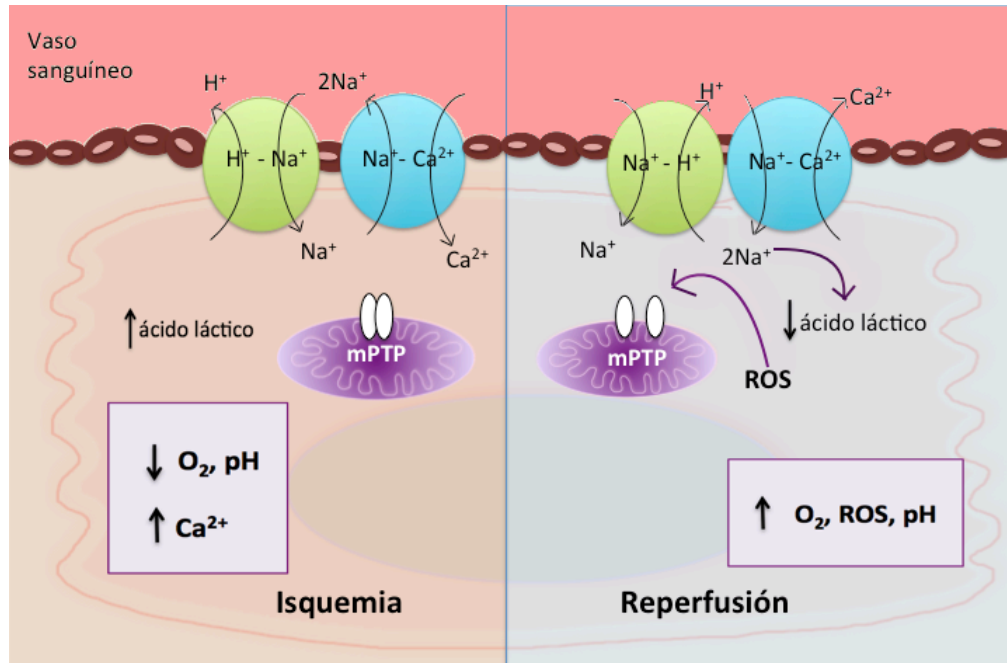


Figura 5. Mecanismos implicados en el daño cardíaco por I/R. Durante la isquemia, la alteración ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ provoca una entrada masiva de Ca^{2+} , la disminución de pH y la producción de ácido láctico debido a la estimulación del metabolismo anaerobio. En el periodo de reperusión, se restaura el flujo y el metabolismo, la ATPasa libera Ca^{2+} hacia el exterior celular, disminuyen los niveles de ácido láctico en el citosol, se restaura el pH y se produce la apertura de mPTP aumentándose la producción de ROS.

Durante la isquemia, el poro de mPTP permanece cerrado. Durante la reperusión se restaura el balance metabólico y la entrada de O_2 y se produce una reactivación de la cadena de electrones y generación de ROS (O^{2-} , OH^- , H_2O_2)¹⁴² que inducen la apertura del mPTP y el desacople mitocondrial. Además, durante la reperusión se elimina el ácido láctico acumulado durante la isquemia, restaurándose de esta manera el pH e incrementando la apertura del mPTP. El exceso de ROS y el daño mitocondrial contribuyen a la muerte celular durante estos procesos. Las células necróticas producen factores que activan el sistema del complemento e inflamación. Las ROS en la zona infartada inducen NF κ B que estimula la secreción de citoquinas proinflamatorias y activan la respuesta inflamatoria⁴³. La infiltración de leucocitos y macrófagos hacia la zona isquémica fagocitan células muertas y desechos celulares.

1.2.2.3. Muerte celular

La muerte celular por necrosis y apoptosis es una de las principales características del IAM y del daño por I/R^{132, 145}. La necrosis predomina durante el periodo de isquemia y se induce por el acúmulo de productos metabólicos, el aumento de Ca^{2+} intracelular y la alteración osmótica. En el área necrótica la apoptosis no desempeña un papel importante.

Sin embargo, en las zonas periféricas no isquémicas, muchas de las células pueden sufrir apoptosis celular ya que este proceso necesita oxígeno y ATP para activarse. Durante el daño por I/R se han visto activas tanto la vía intrínseca como la vía extrínseca de la apoptosis. En este sentido se ha observado que TNFR1 y Fas se sobreexpresan en miocitos cardiacos tras el daño por I/R¹⁵⁰. Además, se produce un aumento del ratio de factores proapoptóticos (Bax)/antiapoptóticos (Bcl-2)⁷ y participan varias rutas de señalización celular como JNK o NFκB. La activación de la ruta JNK está asociada con la producción de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y muerte celular⁶⁵. NF-κB también modula la apoptosis celular durante la I/R²⁴.

Durante la reperfusión cardiaca se puede acelerar el proceso de necrosis pero las células mueren principalmente por apoptosis. Estos procesos repercuten seriamente en la evolución y el pronóstico del paciente, por lo que su control durante la reperfusión podría disminuir la pérdida de cardiomiocitos viables en esta zona y, por tanto, disminuir el tamaño de infarto.

1.2.2.4. Fibrosis

La necrosis celular que se produce durante la isquemia activa el programa reparador de los fibroblastos, depositándose proteínas de MEC en el intersticio del corazón dañado³³. La composición de MEC es fundamentalmente reparativa. De hecho, un defecto en el funcionamiento de las células productoras de MEC o en la formación de la cicatriz (que engloba a las células apoptóticas), puede llevar a complicaciones importantes. Parte de los fibroblastos permanecen en la zona no infartada activados por la situación de estrés, y continúan sintetizando y modulando la síntesis de MEC. Sin embargo, la excesiva acumulación de MEC produce alteraciones en la capacidad del ventrículo para contraerse y dilatarse, dando lugar a la disfunción cardiaca.

1.2.2.5. Hipertrofia

La pérdida de células en el tejido miocárdico también provoca una sobrecarga de presión sobre el ventrículo que induce una forma particular de remodelado en el borde de la zona infartada y en el miocardio distante no infartado. Esta zona no isquémica intenta compensar el daño y se inicia un proceso reparativo¹²⁴. El ventrículo se hipertrofia incrementando su contractilidad. La sobrecarga genera además cambios hemodinámicos y geométricos destinados a compensar el desajuste funcional pero que, a la larga, contribuyen a la disfunción ventricular. Se produce un aumento de los grosores de las paredes ventriculares así como una dilatación progresiva de la cavidad que incrementa el estrés^{124,106}. Esto activa mecanorreceptores de superficie que inician la señalización

prohipertrófica y modifican la expresión de metaloproteinasas, neurohormonas y factores locales¹¹⁹. La prevención del remodelado cardíaco tras el proceso de I/R es de vital importancia para disminuir en la medida de lo posible, la aparición de nuevos eventos.

1.3. Terapias actuales para el tratamiento de la Miocardiopatía Diabética

No existe una terapia específica para el tratamiento de la MCD pero sí estrategias para el control y prevención de la DM2 y factores de riesgo CV asociados. Los pacientes que padecen DM2 poseen una prevalencia de hipertensión del 77-87%, de niveles elevados de LDL (lipoproteínas de baja densidad) del 74-81% y de obesidad del 62-67%¹⁰⁸. Existen evidencias de que la modificación de los hábitos de vida como el abandono del tabaquismo, el aumento de la práctica de ejercicio físico, así como el control de la hipertensión y la reducción de los niveles de LDL en sangre reducen la incidencia de ECV. La prevención del riesgo CV se basa además en el control de la tensión arterial [mediante inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAS), antagonistas del receptor de angiotensina-II (ARA-II), β -bloqueantes, diuréticos y bloqueantes de canales de calcio], de la lipidemia [fundamentalmente mediante estatinas pero también niacina, fenofibrato, ezetimiba y sequestradores de ácidos biliares] y de los procesos trombogénicos [mediante antiagregantes plaquetarios, (aspirina como prevención primaria en aquellos pacientes con DM2 con alto riesgo de ECV⁵)].

El control de la glucemia es fundamental en pacientes DM2. Aunque no se han demostrado efectos beneficiosos del control intensivo de la glucemia a nivel de riesgo macrovascular, existen evidencias sobre su efecto sobre los eventos microvasculares⁶⁴. Cuanto más precoz sea el diagnóstico de la DM2 y antes comience su tratamiento, más posibilidades hay de prevenir las complicaciones CV⁶¹. En la mayoría de los pacientes el tratamiento comienza con dieta saludable, aumento de la actividad física y control de peso. Además, el fármaco de primera elección para el control de la hiperglucemia en DM2 es la metformina, si no está contraindicada y es bien tolerada. Si tras tres meses no se consigue alcanzar el nivel de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) que se persigue, se lleva a cabo una terapia combinada de metformina con uno de los fármacos de los grupos sulfonilurea, tiazinidildiona, inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4i), agonista del receptor de GLP-1 (GLP-1RA) o insulina basal, dependiendo de las características del paciente y de los objetivos que se desean alcanzar. Existen otros fármacos como las meglitinidas o los inhibidores de la α -glucosidasa que son usados como alternativa. Si no se alcanzan los objetivos deseados, se incluye insulina basal. Si a lo largo de tres a seis meses esta terapia

sigue sin ser suficiente, se plantea una triple terapia con insulina más compleja y normalmente uno o dos fármacos no insulínicos⁶².

1.4. Terapias actuales para el tratamiento del Infarto Agudo de Miocardio

En pacientes que sufren un IAM, dentro de las primeras doce horas desde el inicio de los síntomas, se debe realizar una reperfusión mecánica o farmacológica precoz. La angioplastia primaria es la estrategia de reperfusión con mejores resultados, siempre que se pueda realizar dentro de los tiempos exigidos. La fibrinólisis es una estrategia de reperfusión química, y se realiza en los casos en los que la angioplastia primaria no puede realizarse debido a los riesgos hemorrágicos que conlleva^{161,67}. Antes de la angiografía, los pacientes a los que se les practica la angioplastia primaria reciben una combinación de doble antiagregación plaquetaria con aspirina y un y un inhibidor del receptor de P_2Y_{12} (p.e. Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelol) y un antagonista del receptor de adenosina difosfato (p.e. Abciximab, Eptifibatida, Tirofiban), y un anticoagulante (p.e. bivalirudina, enoxaparina). Sin embargo, el IAM producirá cardiopatía isquémica de carácter crónico y los pacientes que se han recuperado tras un evento coronario agudo poseen alto riesgo de presentar nuevos episodios e incluso muerte prematura. Así, tras el tratamiento agudo del IAM, se realizan intervenciones en el estilo de vida (hábito tabáquico, presión arterial, dieta, peso corporal y actividad física) y el tratamiento de doble antiagregación plaquetaria, que combina aspirina y un inhibidor del receptor de P_2Y_{12} , además de un tratamiento con β -bloqueantes, estatinas e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAS). Los inhibidores de los receptores de aldosterona, específicamente la eplerenona, están indicados en aquellos pacientes que presentan una FEVI del 40% menos y presentan, además, insuficiencia cardíaca o DM¹³⁶.

1.5. Potenciales terapias para el tratamiento de la Miocardiopatía Diabética y del Infarto Agudo de Miocardio

Las incretinas son hormonas intestinales secretadas por células enteroendocrinas del intestino que contribuyen a la regulación de la glucemia posprandial⁹⁵. Se han descrito dos incretinas principales, GLP-1 (péptido-1 similar a glucagón) y GIP (péptido insulínico dependiente de glucosa). Estas incretinas son secretadas al torrente circulatorio tras la ingesta de alimento y actúan a través de la unión a su receptor en el páncreas promoviendo la secreción de insulina por las células β (Figura 6).

Otro mecanismo por el cual las incretinas ejercen una acción antihiper glucémica es a través de la inhibición de la secreción de glucagón y el enlentecimiento del vaciado gástrico

y de la movilidad intestinal mediante su acción neuronal. En este sentido, en individuos sanos, el GLP-1 y el GIP son responsables del 50-70% de la respuesta insulínica postprandial, mientras que en pacientes DM2 esta contribución puede ser menor del 20%⁸⁹. En este sentido se ha observado que el efecto incretina, fenómeno por el cual la glucosa oral genera una respuesta de insulina mayor que la glucosa intravenosa, está disminuida en pacientes diabéticos.

Por otro lado, se ha descrito la presencia de GLP-1R en otros tejidos como corazón, intestino, estómago, vasos, riñón, pulmón, músculo y cerebro sugiriendo acciones directas e insulino-independientes^{122,98}. El GLP-1R está ligado a la proteína G y activa señales intracelulares que incluyen cAMP/PKA, PI3K/Akt y MEK/ERK¹⁶⁰. Sin embargo, GLP-1 es susceptible a la actividad catalítica de la DPP-4 que actúa sobre los extremos NH₂ terminales y se degrada en pocos minutos²⁵. El metabolito generado es la amida GLP-1(9-36) que es la forma de GLP-1 predominante en el plasma en el periodo postprandial por su lenta eliminación²⁶. Estudios experimentales recientes sugieren que GLP-1(9-36) podría actuar como antagonista de GLP-1R o interactuar con otros receptores específicos ejerciendo un efecto directo sobre el miocito cardíaco^{97,69}. Estos hallazgos impulsan el interés sobre las incretinas GLP-1 y GLP-1(9-36) en el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades que presentan alteraciones metabólicas como la DM2 o en el IAM¹³⁴. Los fármacos basados en la acción de GLP-1 regulan el metabolismo de la glucosa a través de diferentes mecanismos y ejercen efectos adicionales a su acción antihiper glucemiante. Entre estos efectos se incluyen cambios en la presión arterial, función endotelial, peso corporal, metabolismo cardíaco, función ventricular, aterosclerosis o daño por I/R. Existen dos tipos de fármacos basados en la actividad de las incretinas y que son usados actualmente para la terapia de la DM2, los inhibidores de la DPP-4 y los agonistas de GLP-1R. Los inhibidores de la DPP-4 ejercen un efecto más complejo puesto que aumentan los niveles de GLP-1 endógeno, disminuyen los de GLP-1(9-36) y modifican los niveles de diversos péptidos diana de la DPP-4 con efectos CV como SDF-1, péptido-Y y péptidos natriuréticos.

Los inhibidores de la DPP-4 actualmente desarrollados son la sitagliptina, la saxagliptina, la vildagliptina, la linagliptina y la alogliptina³¹. La sitagliptina aumenta las concentraciones plasmáticas de las formas activas de GLP-1 y GIP y, por tanto, sus efectos. En ensayos clínicos en pacientes con DM2 se demostró que la sitagliptina reduce la HbA_{1c} y la glucemia en ayunas y posprandial.

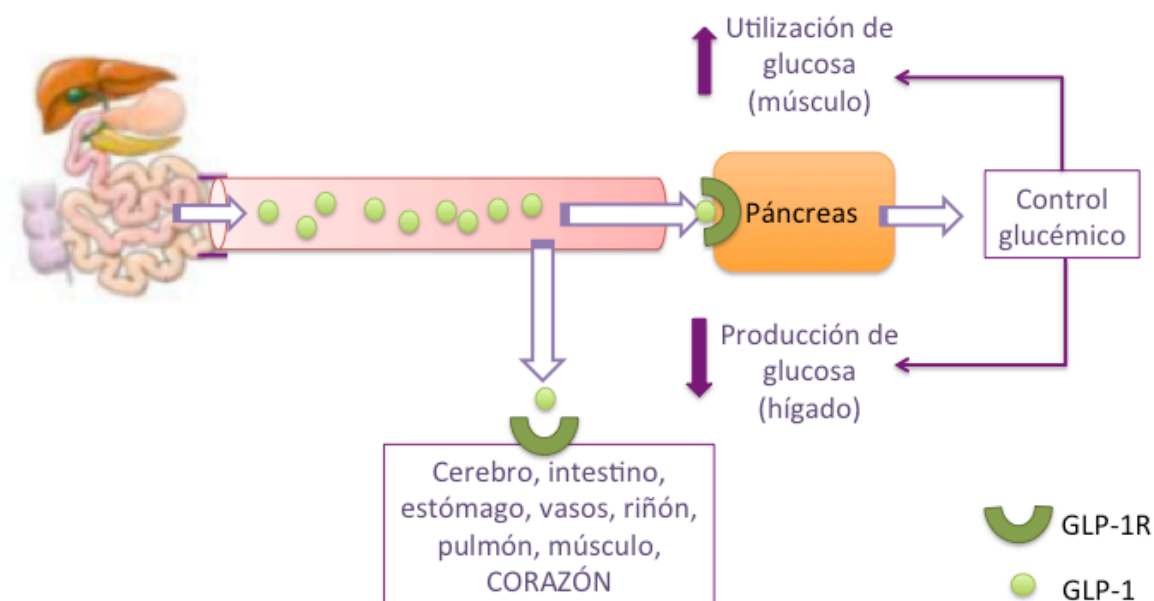


Figura 6. Mecanismos de acción de las incretinas. GLP-1 es secretado a la circulación sanguínea tras la ingesta de alimento y actúa incrementando la síntesis y liberación de insulina por el páncreas y disminuyendo la producción de glucosa hepática, lo que favorece el control glucémico. Además, se ha descrito la presencia de GLP-1R en otros órganos, entre ellos, el corazón, sugiriendo acciones directas de este péptido.

Se están investigando variaciones de GLP-1 que doten a la molécula de una actividad biológica más duradera. La DPP-4 actúa sobre los péptidos que poseen una alanina, prolina o hidroxiprolina en la penúltima posición del extremo NH_2 -, por lo que las investigaciones se han centrado en el estudio de modificaciones en His^7 , Ala^8 , o Glu^9 , o la adición de proteínas o FAs a la molécula de GLP-1. Los agonistas de GLP-1R desarrollados son exenatida, lixisenatida, liraglutida, albiglutida y dulaglutida.

Los agonistas de GLP-1R no son degradados por la DPP-4 y producen sus efectos a través de la unión a GLP-1R. Exenatida fue el primer fármaco del grupo de los agonistas de GLP-1R que se desarrolló para su uso en humanos. Se trata de una forma sintética de Exendin-4, péptido de 39 aminoácidos aislado de las secreciones salivares del reptil Gila monster (*Heloderma suspectum*), que tiene una alta afinidad por GLP-1R y es resistente a la degradación por la DPP-4 por lo que tiene una vida media prolongada^{49, 131}. Exendin-4 comparte un 53% de similitud de secuencia con el GLP-1 endógeno y presenta una glicina en lugar de alanina en la segunda posición del NH_2 - terminal lo que le hace resistente a la degradación por la DPP-4^{131, 49}. La exenatida se administra mediante inyección subcutánea y se elimina por filtración renal¹²¹. La vida media de este péptido en humanos es de 3-4 horas⁷⁰, es detectado en plasma tras 15 horas después de su inyección subcutánea y sus efectos biológicos permanecen varias horas después de su administración⁷⁰. En estudios

clínicos se ha observado un efecto cardioprotector de exenatide, independiente de su efecto sobre la glucemia⁸⁰.

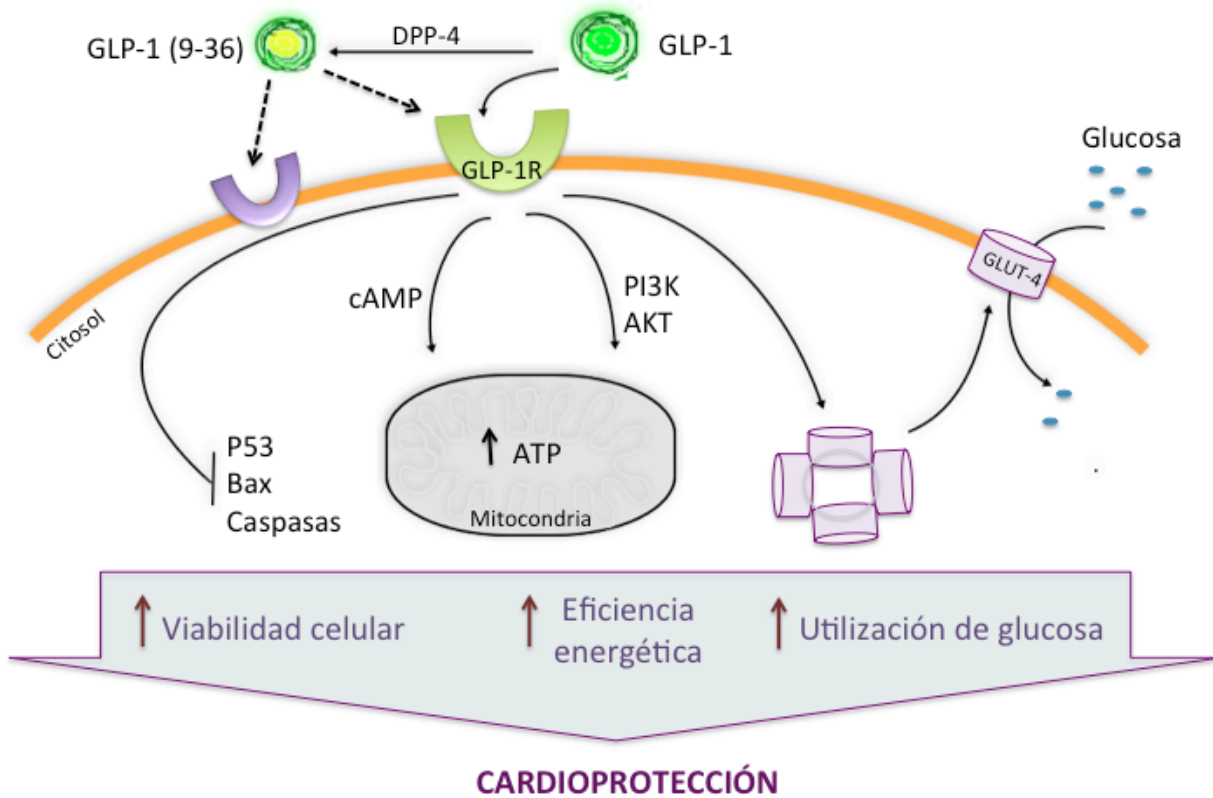


Figura 7. Mecanismos moleculares de las incretinas en los miocitos cardiacos. GLP-1 se une a su receptor específico GLP-1R dando lugar a la activación de las proteínas kinasas cAMP y PI3K que actúan como mediadores en rutas que inducen la supervivencia celular y estimulan la translocación de GLUT-4 a la membrana celular favoreciendo la utilización de glucosa y mejorando la eficiencia energética. GLP-1(9-36) podría ejercer cardioprotección a través de GLP-1R u otros receptores.

Los efectos cardioprotectores tanto de los inhibidores de la DPP-4 como de los agonistas de GLP-1R en estudios clínicos realizados hasta el momento no son concluyentes puesto que ninguno de los ensayos es de larga duración. La mayoría de los estudios con GLP-1 nativo o con agonistas de GLP-1R han demostrado su efecto cardioprotector. Sin embargo, los mecanismos moleculares que están involucrados no se han definido por completo.

2. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

- Hipótesis 1: El conocimiento de los factores alterados en la MCD podría utilizarse para dirigir estrategias farmacológicas que controlan los procesos patológicos asociados.
- Hipótesis 2: La estimulación del sistema incretina ha demostrado efectos beneficiosos en el control de la glucemia, lipidemia y resistencia a la insulina en modelos experimentales y en pacientes DM2. Además, este sistema podría ejercer un efecto beneficioso en el daño cardíaco asociado, mediante mecanismos dependientes e independientes de insulina.
- Hipótesis 3: La estimulación del sistema incretina podría tener un efecto beneficioso en la lesión cardíaca inducida por infarto agudo de miocardio.

Objetivos

Para demostrar nuestras hipótesis planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Analizar el patrón proteómico característico de la miocardiopatía diabética experimental, clasificando los factores alterados en función de su actividad e interacción biológica.
- 2) Evaluar el potencial efecto antifibrótico y antiapoptótico de un inhibidor de la DPP-4 en la DM2 experimental, analizando además las acciones directas de las incretinas GLP-1 y GLP-1(9-36) sobre el cardiomiocito.
- 3) Examinar el potencial papel cardioprotector de un agonista de GLP-1R en un modelo experimental de isquemia/reperfusión.

3. Material y Métodos

3.1 Modelos experimentales

Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo a la normativa internacional vigente (NIH publicación nº 85-23, revisado 1996) y fueron aprobados por el Comité Ético de la institución en la que se realizaron. Después de la recepción de los animales de la correspondiente casa comercial, estos se mantuvieron en jaulas siguiendo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (de 7:00h a 19:00h) y temperatura constante de 25°C. Para evitar interferencias debidas al estrés post-traslado, los experimentos comenzaron siete días después de su llegada al centro.

3.1.1. Modelo experimental de Miocardiopatía Diabética en ratas DM1

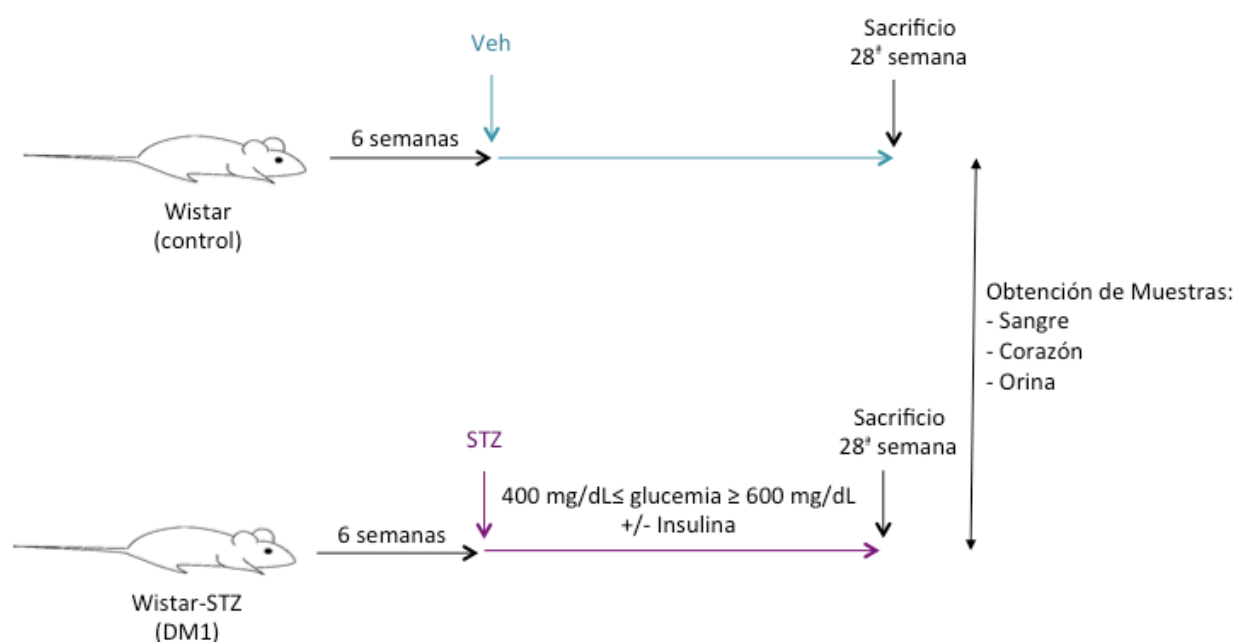


Figura 8. Esquema del modelo crónico de STZ-DM1. Veh: vehículo, STZ: estreptozotocina (50mg/Kg).

En este modelo se utilizaron ratas macho Wistar-Kyoto de 6 semanas de edad que recibieron una inyección del tóxico pancreático estreptozotocina (50 mg/Kg) o vehículo (10mM NaCO₃, pH 4,5) y en las cuales se monitorizaron los valores de glucosa periódicamente para mantener una glucemia entre 400-600 mg/dL. Algunas ratas necesitaron una segunda administración de estreptozotocina y otras recibieron insulina (1-4 IU sc, Insulatard NPH). Como resultado obtuvimos dos grupos de ratas: control (n=10) y STZ-DM1 (n=8). Semanalmente evaluamos los pesos, excreción de proteínas (proteinuria) y presión arterial sistólica (medida por el método “tail cuff”). Las ratas fueron sacrificadas a las 28 semanas de edad (Figura 8).

3.1.2. Modelo animal de Miocardiopatía Diabética en ratas Goto Kakizaki

Para este modelo utilizamos ratas macho modificadas genéticamente que desarrollan DM2, pero no obesidad ni hipertensión, a una edad temprana¹⁰². Las ratas Goto Kakizaki (GK), suministradas por Taconic (Dinamarca), exhiben desórdenes metabólicos, hormonales y vasculares similares a los de los pacientes DM2. Una vez las ratas habían desarrollado DM2 (a las 16 semanas de edad), algunas fueron tratadas con sitagliptina [Merck Sharp & Dohme (España), 10 mg/Kg/día] o con un clásico antidiabético, metformina [Acofarma (España), 200 mg/Kg/día]. Ambos fármacos fueron disueltos en agua para su administración oral diaria (10:00h). Además, utilizamos un grupo de ratas Wistar Kyoto como control y un grupo de ratas GK tratadas con vehículo (n=10, cada grupo). Semanalmente evaluamos los pesos, consumo de dieta y presión arterial sistólica (Figura 9).

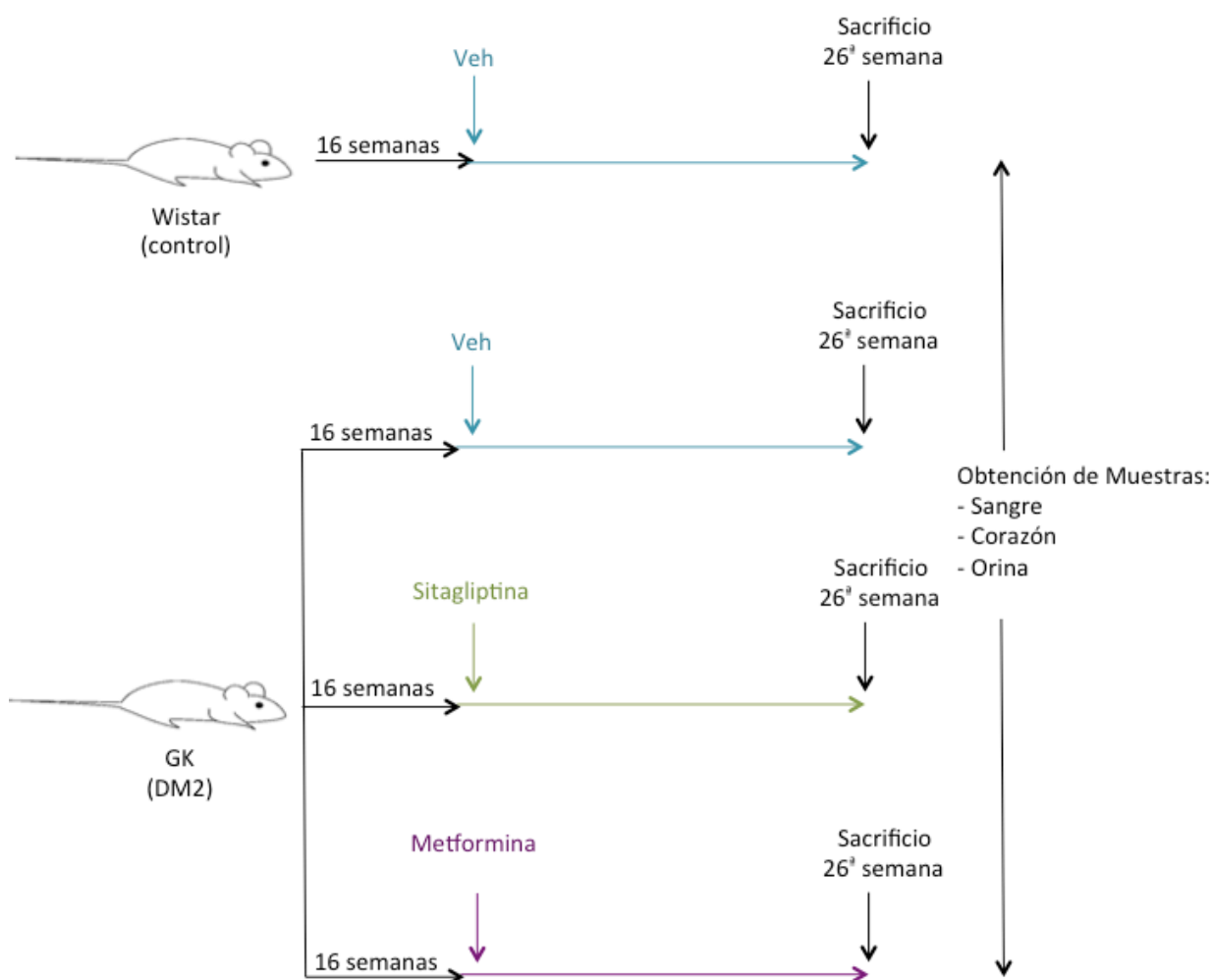


Figura 9. Esquema del modelo animal de MCD en ratas GK. Veh: vehículo. Los tratamientos con sitagliptina (10 mg/Kg/día) y metformina (200 mg/Kg/día) tuvieron una duración de 10 semanas.

3.1.3. Modelo animal de Isquemia/Reperusión en cerdo

A su llegada al centro, los cerdos Yorkshire-Albino se ubicaron en el animalario del Centro de Medicina Comparativa y Cirugía del Hospital Monte Sinaí de Nueva York. Doce horas antes y durante cinco días después del inicio de la intervención (I/R), se administraron 150 mg y 75 mg/día, respectivamente, del antiagregante Clopidogrel. Los animales fueron anestesiados para la cirugía mediante inyección intramuscular de telazol (6 mg/kg), y buprenorfina (0.1 mg/kg). Tras la entubación orotraqueal se mantuvo al animal anestesiado mediante inyección intravenosa continua de propofol (10 mg/kg/hr). Justo antes de la inducción del IAM se realizaron ecocardiografías 2D y 3D para confirmar una función cardíaca normal. Seguidamente se inició el procedimiento para la inducción experimental del daño por I/R tal y como previamente está descrito por este grupo⁶⁰. Los cerdos fueron pretratados con 3000U de heparina, 75 mg de amiodarona y 0.04 mg/Kg de atropina. Además, se administró solución salina en forma de bolo (20 mL/kg) seguida de infusión continua (2 mL/kg/hora) que contenía 75 mg amiodarona, 10 mEq de KCl y atropina (0.04 mg/kg). Para llevar a cabo el acceso arterial se realizó una punción percutánea en la arteria femoral. Se utilizó un introductor de 7.5 French que fue situado mediante la técnica de Seldinger. Posteriormente se introdujo una guía y un catéter hockey-stick de 7 French que fue deslizado a través de la aorta ascendente hasta la arteria coronaria izquierda principal. En este momento se realizó una angiografía para visualizar la anatomía cardíaca coronaria del animal (Figura 10a). Utilizando el catéter como guía y la fluoroscopia para la visualización del recorrido, se introdujo una guía coronaria hasta la arteria coronaria descendente anterior (ADA), acompañada de un catéter con balón coronario de dilatación (TREK OTW Coronary Dilation Catheter 4.0 x 15 mm, Abbot Vascular) que fue situado en la zona media de esta arteria coronaria, justo después de la primera rama septal. Seguidamente se indujo la oclusión de la ADA y se mantuvo 60 minutos con el balón coronario inflado a 10 atm (Figura 10b). Los animales estuvieron monitorizados mediante electrocardiograma y mediante medida invasiva de presión arterial a lo largo de todo el periodo de isquemia. Se prestó especial atención a la detección temprana de arritmias ventriculares con el fin de intervenir lo antes posible con desfibrilación. Diez minutos antes de la reperusión, se administraron 10 µg de exenatida (Amylin Pharmaceuticals, Inc.; San Diego, CA) por vía intravenosa a algunos animales, y este tratamiento se continuó durante los siguientes tres días, con dos dosis subcutáneas diarias del fármaco (Figura 11). Los animales control recibieron una inyección de salino en estos mismos tiempos. Después de 60 minutos, el balón fue desinflado y retirado de la ADA. La reperusión de la arteria fue registrada mediante una angiografía coronaria final (Figura 10c).

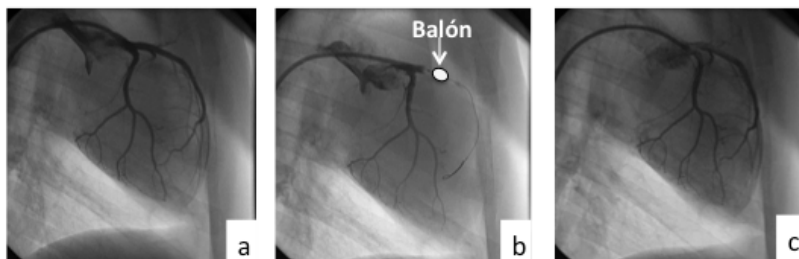


Figura 10. Imágenes representativas de las angiografías realizadas durante la inducción de la I/R. (a) Angiografía antes y **(b)** durante la oclusión coronaria. Se observa la arteria coronaria descendente anterior (ADA) ocluida a nivel de su segmento proximal. **(c)** Angiografía durante el restablecimiento del flujo sanguíneo o perfusión.

Posteriormente se retiró el introductor situado en la arteria femoral y se aplicó presión manual durante 15-20 minutos en la zona para conseguir la hemostasis. El cuidado del animal tras el procedimiento consistió en la administración de cefazolina (25 mg/kg), buprenorfina (0.1 mg/kg) y solución salina con amiodarona (75 mg/500 ml) infundida a 50 mL/hora durante 12 horas.

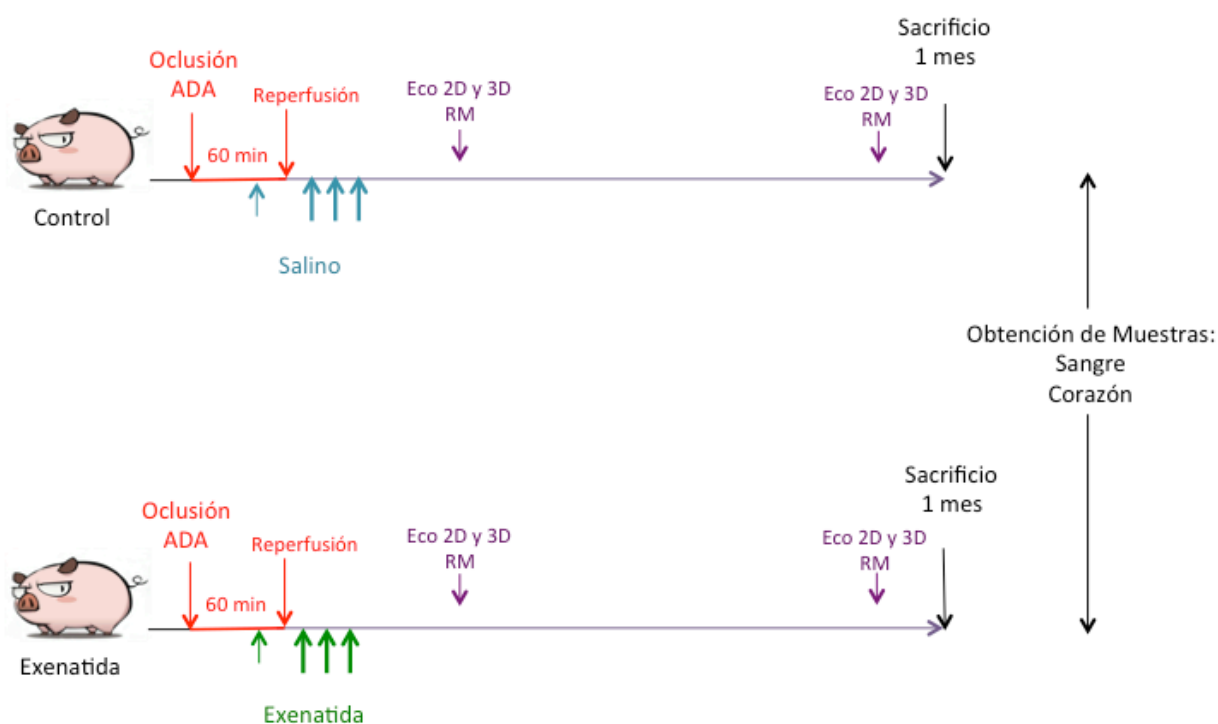


Figura 11. Esquema del modelo porcino de Isquemia/Reperusión. La oclusión de la ADA para la inducción del IAM se mantuvo durante 60 minutos. El tratamiento con exenatida (o solución salina en los animales control) comenzó con una única inyección intracoronaria de 10 μ g del fármaco 10 minutos antes de la reperusión, y continuó durante los siguientes 3 días con una dosis de 10 μ g dos veces al día. Se realizaron ecocardiografías 2D y 3D así como RM una semana y un mes después del IAM.

3.2. Técnicas de Imagen para la determinación de la anatomía y funcionalidad del corazón

3.2.1. Ecocardiografía

La ecocardiografía cardíaca de las ratas se realizó con los animales anestesiados con isoflurano (1,5%), antes (no mostrado) y una vez hubieron finalizado los tratamientos. Se realizaron tanto el modo-M como el ecocardiograma-2D utilizando un transductor de 12 MHz (En Visor-C-HD, Philips). Las imágenes se obtuvieron desde la ventana paraesternal izquierda y derecha en posición decúbito supino. A partir del trazado en modo-M se determinaron diámetro del VI en telediástole (DDVI), diámetro del VI en telesístole (DSVI) y FEVI (por el método de Teichzol). El grosor de los cuatro segmentos [pared anterior, septo interventricular (SIV), lateral y pared posterior del VI (PPVI)], fueron evaluados a partir de las imágenes del eje corto adquiridas en 2D. El índice de masa del VI (IMVI) se obtuvo a partir del método de Devereux teniendo en cuenta los grosores de la PPVI, SIV y DDVI, y normalizando los valores con el peso corporal como se había descrito previamente³⁵.

Los estudios de ecocardiografía 2D en el modelo porcino de I/R se realizaron con un sistema iE33 con un transductor S5 (Philips Medical Systems, Andover, MA), de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Americana y Europea de Ecocardiografía⁷¹. Los animales se mantuvieron anestesiados por infusión intravenosa continua de propofol (10 mg/kg/hora) a lo largo de todo el ecocardiograma. El análisis de las imágenes, medidas y cuantificaciones se realizaron directamente en el sistema iE33. Las imágenes ecocardiográficas de cine en 3D del volumen completo fueron tomadas con el mismo sistema y utilizando un transductor X3 (Philips Medical Systems, Andover, MA). Se tuvo especial cuidado a la hora de incluir la cavidad completa dentro del volumen piramidal de adquisición. Los parámetros para la visualización del endocardio fueron optimizados y se obtuvieron al menos 3 grupos de datos que fueron almacenados digitalmente para su posterior análisis. Las imágenes fueron analizadas con el programa comercial Q-Lab software (Philips Medical Systems, Andover, MA). La superficie endocárdica fue reconstruida semiautomáticamente en 3D a lo largo de los ciclos cardíacos. Seguidamente, la superficie miocárdica fue ajustada de forma manual siempre que fuera necesario. Para determinar la deformación del VI, llevamos a cabo un análisis speckle tracking 3D, utilizando un programa para el análisis 4D del VI (TomTec Imaging Systems, Germany). Además, se seleccionaron planos apicales de dos y cuatro cámaras y planos de eje corto a diferentes niveles del VI al final de la diástole. La superficie endocárdica en 3D fue reconstruida de manera automática y situado en un espacio 3D a lo largo del ciclo cardíaco. Seguidamente, la superficie endocárdica fue ajustada manualmente cuando fue

necesario. El VI se dividió automáticamente en 16 segmentos tridimensionales usando una segmentación estándar determinándose los strains 3D longitudinal (LS), circunferencial (CS) y radial (RS) en todos ellos.

3.2.2. Resonancia Magnética

Los estudios con RM se llevaron a cabo en un escáner 3.0 Tesla (Achieva, Philips Medical Systems, Holanda). Para la cuantificación de los volúmenes, masa y FEVI se utilizaron imágenes de cine de eje corto en estado de precesión libre (en inglés, SSFP, Steady State Free Precession) desde la base del VI hasta su ápex (Tabla 1). Para ello, se trazaron los contornos epicárdico y endocárdico al final de la diástole y al final de la sístole; incluyéndose los músculos papilares en la cavidad del VI.

TR	TE	Ángulo de giro	Ventana de adquisición	Ancho de banda	Líneas
3,6 ms	1,6 ms	45°	250x250	1286	12

Tabla 1. Parámetros técnicos de la secuencia de cine (SSFP).

Para la determinación del área en riesgo se utilizaron secuencias ponderadas en T2 (Tabla 2), los bordes epicárdico y endocárdico se trazaron manualmente en cada vista contigua del eje corto. El área en riesgo se definió como el área hiperintensa de las imágenes obtenidas por secuencias ponderadas en T2. El área fue considerada superintensa cuando la intensidad de la señal era mayor de 3 desviaciones estándar de la intensidad de señal en la zona remota o miocardio normal. Se tuvo cuidado para excluir el flujo lento de sangre a través de las trabéculas.

TR	TE	TI	Ventana de adquisición	Bandwidth	Longitud Eco
2-3 latidos	60 ms	250 ms	250x250	926 ms	16

Tabla 2. Parámetros técnicos de la secuencia ponderada en T2.

El tamaño de la cicatriz del VI se determinó por realce tardío de gadolinio (RTG, Tabla 3) y se expresó como porcentaje de masa de VI. La adquisición de las imágenes por RTG se realizó 15 minutos después de la inyección de gadolinio (Magnevist, 0.2 mmol/kg) usando una secuencia de gradiente Eco de inversión-recuperación.

TR	TE	TI	Factor gating	Ventana de adquisición	Bandwidth	TFE factor
9 ms	5,4 ms	Optimizado	3	250x250	232 Hz/px	16

Tabla 3. Parámetros técnicos de la secuencia de RTG.

Todas las imágenes fueron analizadas con el programa comercial disponible (Extended MR Workspace, Philips Medical Systems, Netherlands). La zona de infarto se definió cuando la intensidad de señal era mayor que tres veces la desviación estándar del tejido remoto o miocardio normal. El VI se dividió en 16 segmentos a cada uno de los cuales se le asignó un valor desde cero hasta cuatro según el porcentaje de miocardio que estaba cicatrizado (0= no scar, 1= menos de 25% cicatriz, 2= 25 a 50% de cicatriz, 3= 50 a 75% de cicatriz, 4= más de 75% de cicatriz). El valor final (índice de transmuralidad de la cicatriz) fue calculado como la suma de los 16 segmentos. El miocardio recuperado se determinó como el área en riesgo (g) - el tamaño de infarto (g) derivado del tamaño de la cicatriz. El índice de recuperación del miocardio se calculó como $[\text{Área en riesgo (g)} - \text{Tamaño de infarto (g)}] / \text{Área en riesgo (g)}^2$, y expresado como porcentaje de VI.

Para la estimación de la fibrosis intersticial se utilizó la técnica no invasiva de T1 mapping mediante RM. Este grupo validó previamente los tiempos T1 postcontraste por secuencia Look-Locker como medida no invasiva de fibrosis miocárdica intersticial, usando tinciones histológicas como técnica mejor validada. Se utilizó la secuencia Look Locker 10 minutos después de la administración del gadolinio para la adquisición y el análisis del realce tardío de gadolinio para el cálculo del tiempo T1.

3.3. Sacrificio y extracción de muestras

En los modelos de MCD en ratas STZ-DM1 y DM2, después de 28 y 26 semanas respectivamente, anestesiábamos a los animales con isoflurano (1,5%), extrajimos sangre y aislamos los corazones (15:00 -19:00 h). Los parámetros sanguíneos (perfil lipídico, glucosa, y parámetros de daño severo hepático y renal) fueron medidos en el departamento de Análisis Clínicos del Hospital. Los corazones fueron perfundidos y lavados con PBS, secados y pesados. Después de desechar las aurículas, se tomó una sección transversal del corazón para su inclusión en parafina. El resto del VI fue congelado en N₂ para posteriores análisis.

En el modelo porcino de I/R, durante la hora posterior a la toma de imágenes, los animales fueron sacrificados por inyección intravenosa de KCl (20 mEq i.v.). Inmediatamente después se extrajeron los corazones y se realizaron siete cortes del mismo grosor a lo largo del eje corto del VI, a nivel de la inserción del músculo papilar. Se recogieron muestras de tejido de la zona de la cicatriz, borde y remota, parte se incluyó y congeló en medio OCT (TissueTek, California) para los estudios histológicos y parte se congeló para el análisis molecular. Visualizamos el tamaño final del infarto en los cortes restantes a través de la tinción con cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio y se tomaron imágenes de alta resolución pudiendo diferenciar el área infartada (blanco) y el miocardio no infartado (rojo). Las

imágenes se cuantificaron utilizando el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD). El volumen de infarto se expresó como porcentaje del volumen total del miocardio.

3.4. Test de tolerancia a la glucosa

Las muestras de sangre de rata se obtuvieron (a través de la vena caudal) el mismo día del sacrificio tras una noche de ayuno (n=10, cada grupo). En ese momento las ratas recibieron su correspondiente dosis de vehículo o sitagliptina, y se obtuvo plasma inmediatamente después, y antes de la administración de una solución de glucosa (0,5 g/Kg). Quince y sesenta minutos después de la administración de la glucosa, se obtuvo plasma de nuevo. Los niveles circulantes de glucosa y de insulina fueron medidos por ELISA (Mercodia AB; Suecia). El contenido de GLP-1 en el plasma se determinó según el método descrito por Ørskov y Holst¹⁰¹, con algunas modificaciones. La recuperación de GLP-1 por este método es de aproximadamente el 60%. Las muestras [recogidas en tubos (Vacutainer P700, BD: USA) que contenían inhibidor de la enzima DPP-4] se mezclaron con 0,5M de EDTA, 10,000 UIC/ml de aprotinina y metanol absoluto a 4°C durante 1 hora, y centrifugaron a 3,000 rpm y a 4°C durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron congelados en N₂, liofilizados y disueltos en 0,2 M glicina, 0,5% albúmina de suero humano, 500 U Trasylol por mL (pH 8,8). Para el cálculo de la concentración de GLP-1 mediante ELISA (Epitope Diagnostic Inc.; USA) se usaron 100 µl de esta solución.

3.5. Cultivos celulares

Para los experimentos *in vitro* se utilizó una línea de células musculares cardíacas, HL-1, procedente de un linaje celular tumoral de aurícula de ratón. Las células HL-1 (amablemente cedidas por el Dr. Zalba, Pamplona) mantienen características morfológicas y bioquímicas y presentan un patrón de expresión genético similar a los miocitos adultos²¹. Las células fueron sembradas en placas previamente tratadas con gelatina-fibronectina (Sigma-Aldrich) 24h antes de la siembra y cultivadas en medio Claycomb (Sigma-Aldrich), suplementado con 10% (vol/vol) suero fetal bovino (FBS) (Lonza) de complementado, 100 IE/ml Na⁺-Penicilina (Lonza), 2 mM L-Glut (Lonza), 10 µM Norepinefrina (Sigma-Aldrich) y 5 mM D-Glucosa (Sigma-Aldrich). Se utilizaron también fibroblastos cardíacos aislados de ratas Wistar macho adultas mediante centrifugación diferencial de células cardíacas extraídas mediante perfusión retrógrada en un sistema Langerdoff con solución de Tyrode libre de Ca²⁺ y digestión enzimática (250 UI de collagenasa tipo-II)⁸⁴. Los fibroblastos fueron resuspendidos en medio DMEM (Lonza) suplementado con 10% FBS de complementado, 2 mM L-Glut, 100 U/ml penicilina/estreptomicina, 10 mM L-piruvato y 2mM HEPES (Sigma-Aldrich). Estas células se

utilizaron entre su 2º y 3º pase. Además, utilizamos una línea de fibroblastos intersticiales (TFB; amablemente cedidas por el Dr. Nielson, USA) derivadas de riñón de ratón¹²⁶, que fueron cultivadas en medio RPMI-1640 5% FBS de complementado, 2% penicilina/estreptomicina y 5 mM D-Glucosa. En todos los casos las células se depleccionaron en medio de cultivo sin FBS durante 12-16 horas antes de comenzar los tratamientos. Para mimetizar un ambiente hiperglucémico e hiperlipidémico en cultivo, se estimularon las células con alta concentración de D-glucosa (HG, 33 mM) o con un ácido graso saturado común, palmitato de sodio (PA, 0,25 mM), durante 6 -24h. Para la estimulación con PA, se conjugó previamente con BSA a un ratio molar de 3:1 como se ha publicado previamente⁵⁶. Las células control fueron tratadas de la misma forma, pero en ausencia de PA. Algunas células fueron estimuladas con sitagliptina (1h, 0,5 µM) debido a que su pico en plasma después de un tratamiento oral de 10 mg/Kg es de alrededor de 0,5-0,6 µM, el cual produce una inhibición casi completa de la DPP-4⁶³. GLP-1 (1 mM), GLP-1(9-36) (0,3 nM) (Sigma-Aldrich), o metformina cloridrato (5mM) se añadieron 30 minutos antes de la estimulación con HG o PA. Un agonista de PPARδ [GW0742 (10 µM), Santa Cruz Biotechnology] o un antagonista de PPARδ [G5797 (10µM), Sigma-Aldrich] fueron añadidos 24 horas antes de la estimulación.

3.6. ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

Los niveles GLP-1 e insulina circulantes se determinaron mediante ensayos de inmunoabsorción (ELISA) siguiendo los protocolos indicados por cada fabricante, Epitepe Diagnostic Inc y Mercodia AB, para la detección de GLP-1 e insulina, respectivamente.

3.7. Estudios morfológicos e inmunohistoquímicos

Las muestras de tejido de rata o cerdo incluidas en parafina se cortaron con micrótopo en secciones de 4 µm y fueron montadas en portaobjetos de carga positiva (Dako FLEX IHC). Para el desparafinado e hidratación del tejido, las muestras se mantuvieron en la estufa a 60°C durante 1 hora y posteriormente se incluyeron en xileno durante 10 minutos y en un gradiente decreciente de alcohol etílico (100°: 5min, 96°: 5min y 70°: 5min). La morfología del corazón se contrastó empleando tinción tricrómica de Masson y tinción de hematoxilina/eosina (H/E) según los protocolos habituales (Bio-Optical). Además, se realizó la tinción de Rojo Sirio (3-5 días en alcohol al 70% y tinción con rojo Sirio-ácido pícrico) que tiñe las fibras de colágeno de color rojo intenso y el resto de la célula de amarillo. Posteriormente, se evaluaron las muestras mediante microscopia óptica. Para la evaluación histológica de los grosores de PPVI y SIV, se tomaron secciones en parafina y se tiñeron con H/E. Los grosores de PPVI y SIV se determinaron como la media de 4-5 medidas en la misma región del corazón

y de todos los animales, usando el programa Metamorph. Se eligió una imagen representativa que fue obtenida por microscopía óptica. El tamaño celular de los cardiomiocitos de la zona de PPVI se obtuvo a partir de los cortes teñidos con H/E en los que se cuantificaron las áreas celulares transversales de cardiomiocitos situados en esta zona, en veinte campos elegidos aleatoriamente con el programa Metamorph.

3.7.1. Inmunohistoquímica dirigida

Los cortes de tejido de rata desparafinados e hidratados fueron tratados durante 30 minutos con una solución de 3% H₂O₂/metanol (1:1) para el bloqueo de la peroxidasa endógena. Las uniones inespecíficas fueron bloqueadas mediante un tampón de bloqueo (PBS 5% albúmina y 10% suero específico). Se incubaron los cortes con anticuerpo primario (anti-colágeno tipo-I (Calbiochem), anti-CTGF (Torrey-Pines) durante toda la noche a 4°C y, tras varios lavados con PBS, con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de varios lavados, la inmunohistoquímica se reveló con AB estreptavidina y cromógeno diaminobencidina (DAB). Como control negativo se utilizó la ausencia de anticuerpo primario en algunas secciones. En todos los casos, las fotografías fueron tomadas a 40X y analizadas con el programa Image Pro Plus.

3.7.2. Inmunofluorescencia tisular y celular

Las muestras de miocardio congeladas en OCT del modelo porcino se cortaron con criostato en secciones de 4 µm, se colocaron en portaobjetos de poly-L-Lisina y se conservaron a -80°C. Para llevar a cabo la inmunofluorescencia de las muestras de tejido se fijaron en una solución de formol salino al 4% durante 10 minutos. Para evitar uniones inespecíficas las secciones se bloquearon durante 1 hora a Tª ambiente con PBS/BSA 10% y 4% del suero correspondiente. Se incubaron con anticuerpo primario anti-vinculina (Sigma-Aldrich) durante toda la noche a 4°C y, posteriormente, con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa488 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de cada paso anterior las muestras se lavaron con PBS y Tween al 0.05%.

En los experimentos *in vitro*, las células se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubres de cristal. A continuación se estimularon como correspondía en cada experimento para la posterior detección de FN o actina. Tras realizar el experimento, se lavaron con PBS, fijaron con PFA (4%) durante 10 minutos a temperatura ambiente y permeabilizaron con 0,1% Triton X-100 durante 1 minuto en hielo. Después se bloquearon con 4% BSA y 10% suero de oveja en PBS 1x durante 1 hora y se incubaron en agitación durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario [anti-Fibronectina (Millipore) o anti-F-actina-Faloidina (Sigma-Aldrich)

(1/500)]. Tras lavarlas con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con FITC en el caso de la detección de FN, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Los núcleos se contrastaron con 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) (Sigma-Aldrich) y se montaron con Mowiol 40- 88 (Sigma-Aldrich). Como control negativo tanto de muestras celulares como de tejido, se utilizó la ausencia de anticuerpo primario en alguno de las condiciones *in vitro* o secciones de tejido.

Las imágenes se visualizaron y se tomaron a X40 en un microscopio confocal (Leika) y se analizaron posteriormente con el programa Image ProPlus.

3.7.3. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling)

El marcaje TUNEL para la detección de núcleos apoptóticos en el tejido miocárdico de rata fue realizado con un ensayo comercial según el protocolo detallado por el fabricante (CardioTACSTM, R&D Systems). Las células apoptóticas presentan un marcaje nuclear azul. Como control negativo se utilizaron tejidos no tratados con la enzima dUTP-transferasa (no mostrado). La estimación semicuantitativa del porcentaje de células apoptóticas se determinó utilizando el programa Metamorph, como el número de núcleos positivos en relación al número total de células (10 campos/ muestra).

3.8. Análisis proteico

3.8.1. Western Blot

Las proteínas se extrajeron de unos 50 mg de tejido congelado en nitrógeno líquido mediante un homogeneizador (Bullet Blender, CultiK) en tampón de lisis [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (1 mmol/L), coctel de inhibidores de proteasas (1 µl/ml), fluoruro sódico (NaF) (25 mmol/L), Ortovanadato sódico (Na_3VO_4) (100 µM) y Ditiotreitól (DTT) 1 mM] (Sigma Aldrich). Posteriormente se determinó la concentración de proteínas mediante método del ácido bicinconínico (BCA de Pierce). Cantidades iguales de proteína de los lisados totales de tejido o células se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS a distintos porcentajes y en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) y se bloquearon para evitar uniones inespecíficas en tampón TBS con 0,1% de Tween 20 (TBST) y 5% de leche durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios (Tabla 4) diluidos en tampón bloqueo durante toda la noche a 4°C. Después de varios lavados con TBST, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente cuya unión sirvió para la detección quimioluminiscente de las bandas con reactivo ECL-Plus (GE-

Healthcare). Para la cuantificación de la fibronectina soluble, se recogieron los medios de cultivo de cada condición experimental y se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C para desechar el debris celular, y se cargaron 20µg en geles de poliacrilamida. Puesto que las células no secretan GAPDH, se utilizó la tinción de Ponceau como control de carga. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J. Se muestra la imagen de un gel representativo de todos los animales, al menos, tres experimentos *in vitro* independientes, con su cuantificación.

Anticuerpo	Especificidad	Casa comercial	Dilución utilizada
Anti-Akt	H, M, R	Cell Signaling	1/1000
Anti-AMPK	H, M, R	Cell Signaling	1/1000
Anti-Anexina 5	H, M, R	Abcam	1/1000
Anti-Bax	H, M, R	Pharmingen	1/1000
Anti-Bcl-2	H, M, R	Santa Cruz bt.	1/1000
Anti-Cleaved-Asp-175-Caspasa-3	H,M, R	Cell Signaling	1/1000
Anti-Caspasa-3	H, M, R	Cell Signaling	1/1000
Anti-Colágeno-I (precursor)	H, M,	Millipore	1/1000
Anti-p44/42 MAPK (Erk1/2)	H, M, R,	Cell Signaling	1/1000
Anti-Fas	H	Santa Cruz bt.	1/1000
Anti-Fas-L	H, M, R	Santa Cruz bt.	1/1000
Anti-Fibronectina	H, M	Millipore	1/5000
Anti-GAPDH	H, M, R	Sigma Aldrich	1/5000
Anti-p-Akt (Thr308)	H, M, R	Cell Signaling	1/1000
Anti-p-AMPK	H M R	Cell Signaling	1/1000
Anti-p-p44/42 MAPK (Erk1/2)	H, M, R	Cell Signaling	1/1000
Anti-PPARδ	H, M, R	Aviva Systems Biology	1/500
Anti-tubulina	H, M, R	Sigma Aldrich	1/10000
Anti-TGFβ	H, M, R	Abcam	1/1000

Tabla 4. Relación de anticuerpos primarios empleados. Reactividad: H: Human, M: Mouse, R: Rat.

3.8.2. Ensayo de actividad de unión al ADN (EMSA)

Los tejidos en N₂ fueron pulverizados y resuspendidos en tampón A (10 mmol/L HEPES pH=7,8; 15 mmol/L KCl; 2 mmol/L Mg/Cl₂; 1 mmol/L EDTA; 1 mmol/L DTT; 1 mmol/L PMSF). Mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 5 min se separó la fracción citosólica de la nuclear. El precipitado (núcleos) se resuspendió nuevamente en tampón A. Se añadió KCl 3 mol/L hasta una molaridad final de 0,39 mol/L, se incubaron durante 45 min a 4 °C y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 30 min a esa misma temperatura. Los sobrenadantes se sometieron a diálisis en tampón B durante toda la noche a 4 °C (50 mmol/L HEPES pH=7,8; 50 mmol/L KCl; 10% glicerol; 1 mmol/L PMSF, 1mmol/L DTT y 0,1 mmol/L EDTA). La concentración de las proteínas se determinó por BCA.

La actividad de unión al ADN de Smad 3/4 y de AP-1 fue evaluada incubando 10 µg de extracto proteico de las muestras de miocardio, con el oligonucleotido consenso de Smad 3/4 o AP-1 (Promega) marcado radiactivamente mediante incubación a 37°C durante 30 minutos con 10U de T₄ polinucleotido quinasa (Promega), 10 µCi de [γ -³²P]-ATP, 70 mmol/L de Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂ y 5 mmol/L DTT. Finalmente la reacción se detuvo con EDTA hasta una concentración final de 0,05 mol/L y se llevó hasta un volumen final de 100 µl con tampón TE (tampón Tris-EDTA). Para establecer la especificidad de la reacción, se incluyeron como control negativo un ensayo de competición con un exceso (100 veces) del oligonucleotido Smad 3/4 o AP-1 sin marcar. Los complejos proteína-ADN fueron separados del exceso de sonda no unida en un gel no desnaturizante de poliacrilamida al 4%, en 0.25% TBE a 150 v durante 2 horas a temperatura ambiente. Después los geles fueron deshidratados a 80°C durante 2 horas, y se expusieron las autorradiografías, para ser cuantificadas por densitometría. La intensidad de las bandas es proporcional a la capacidad de unión de los factores de transcripción al ADN.

3.8.3. Análisis proteómico y predicción de rutas moleculares

Las muestras de VI de ratas control y STZ-DM1 (n=6 por grupo) fueron pulverizadas y disueltas en tampón de lisis (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS y 30 mM Tris-pH 8,5) con 50 mM DTT. Después de su centrifugación durante 5 min a 12,000 rpm, se recogió el sobrenadante y purificó mediante el kit 2D Clean Up (GE Healthcare). El precipitado fue disuelto en tampón de lisis y se determinó la concentración proteica mediante el ensayo RC-DC (Bio-Rad). Las proteínas fueron después analizadas por 2D-DIGE (electroforesis en gel, en dos dimensiones) (GE Healthcare) como se ha descrito previamente¹⁰⁵. 50 µg de extractos proteicos fueron marcados con 400 pmol de Cy3 o Cy5 en hielo y en oscuridad durante 30 min. Todos los experimentos se realizaron con un control interno estándar que contenía cantidades iguales de cada uno de los lisados y que fue marcado con Cy2. La reacción de marcaje se detuvo con 1 µl de lisina 10 mM en hielo durante 10 min en oscuridad. Pares de muestras de extractos STZ-DM1 y control, y proteínas estándar se combinaron y corrieron en un único gel (150 µg total de proteína). Los extractos proteicos fueron diluidos en tampón de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS y trazas de azul de bromofenol) con 50 mM DTT y 0,8% tampón IPG3-11NL hasta un volumen final de 80 µl y aplicados por “cup-loading” en tiras IPG de 24 cm pH 3-11 (Ge Healthcare) previamente rehidratadas con 400 µl de tampón de rehidratación que contenía 100 mM de hidroxietildisulfido (HED, solución DeStreak; GE Healthcare) y 0,8% de tampón IPG3-11 NL. La primera dimensión corrió a 0,05 mA/tira IPG en un sistema IPGphor IEF (GE Healthcare) seguido de un ascenso de voltaje en 4

pasos: 300 V durante 3 horas, gradiente linear hasta 1000 V en 4 horas, gradiente linear de voltaje hasta 8000 V en 2h y 8.000 V hasta el estado estático (alrededor de 40.000 Vh). Tras esta primera dimensión, las tiras fueron equilibradas en oscuridad con tampón de equilibrado SDS [75 mM Tris pH 8,8, 6 M urea, 30% glicerol (v/v), 2% SDS (m/v) y trazas de azul de bromofenol] que contenía 1% (m/v) DTT durante 15 min y, a continuación, en tampón de equilibrado que contenía 4% iodoacetamida (m/v) durante otros 15 min adicionales. Las proteínas fueron entonces separadas en geles Tris-glicina 10% usando un sistema Ettan Dalt Six (GE Healthcare) a 25°C hasta que el frente hubo migrado hasta el extremo inferior del gel. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron escaneados (Typhoon 9400 (GE Healthcare) a una resolución de 100 μ M usando las longitudes de onda y filtros adecuados para la detección del marcaje Cy2, Cy3 y Cy5. Para la cuantificación relativa de la proteína en las muestras STZ-DM1 y control se utilizó el programa DeCyder v 7,0 y el análisis estadístico EDA (Extended Data Analysis) (Ge Healthcare). Los spots de proteína que mostraron alteraciones se aislaron para su digestión y análisis por MALDI-MS (Espectrofotómetro de masas Ultraflex MALDI-TOF/TOF). Estos datos fueron usados para la búsqueda de proteínas en bases de datos (NCBI; $\sim 6,5 \times 10^6$ entradas) usando el programa Mascot. Los listados de proteínas diferencialmente expresadas junto con sus correspondientes variaciones frente a control y su número de acceso fueron incorporados en los programas IPA® (Ingenuity Systems) y Pathways Architect® (Stratagene, La Jolle, CA, USA) para la identificación de potenciales rutas biológicas y moleculares relacionadas. Las bases de datos IPA y Architect están formadas por ortólogos humanos, de ratón y de rata. Las redes proteicas se generaron a través de algoritmos según la relación entre las distintas proteínas. La clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas se realizó mediante GenCards®.

3.9. Análisis genético. Transcripción inversa y PCR a tiempo real

Las muestras de corazón congelado en N₂ o 5×10^5 células se homogeneizaron en 1 ml de Trizol® (Invitrogen). Después se siguió el protocolo de extracción de ARN recomendado por el fabricante. La cuantificación de ARN se determinó a partir de la absorbancia a 260 nm y su pureza se calculó mediante la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. 1,5 μ g de ARN total se sometió a transcripción inversa. Para ello se preparó una mezcla de 1,5 μ g RNA, 5 μ l de Buffer 10X para transcripción inversa, 2 μ l de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), 0,25 μ l de inhibidor de ARNasa, 2,5 μ l de transcriptasa inversa y agua libre de RNAsas, hasta completar un volumen total de 45 μ l. El ADNc resultante se utilizó para analizar la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (QPCR) multiplex utilizando 33 ng de cDNA, 0,25 μ l de sonda Taqman para los genes de interés y control endógeno, 5 μ l de buffer premix, y agua libre de RNAsas (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron: 2

minutos a 50°C, 10 segundos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C en un sistema Applied Biosystems 7500. Las sondas utilizadas fueron FN (Rn00569575_ml), TGFβ (Rn00572010_m1), CTGF (Rn00573960_m1), BNP (Rn00580641_m1) y α-SMA (Rn00570060_g1) con fluoróforo FAM, y el gen ribosómico eucariota 18S (4310893E) marcado con con fluoróforo VIC como control endógeno. Para la detección de GLP-1R, 100ng de ADNc fueron preamplificados (10 min a 95°C y 10 ciclos de 15 seg a 95°C y 4 minutos a 60°C) con Master Mix TaqMan de preamplificación (Applied Biosystems) antes de llevar a cabo la QPCR singleplex con sonda GLP-1R (Rn00562406) y 18S. Todas las muestras se prepararon por triplicado para obtener su ciclo de amplificación Ct (threshold cycle). Si la desviación de cada triplicado era mayor de 0,3 ciclos, la Ct no era considerada. Las cuantificaciones presentadas fueron el resultado del análisis de todos los animales o, al menos, 3 experimentos *in vitro* independientes.

3. 10. Análisis estadístico

Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar de la media. El análisis estadístico de los resultados se realizó con el software estadístico SPSS versión 11.0. Se realizaron múltiples comparaciones por test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de test de Mann-Whitney. En el caso del análisis proteómico se utilizó el test paramétrico T-Student para comparar las medias de los spots entre grupos. Para los conjuntos de muestras se realizó un análisis multivariantes de componentes principales utilizando un algoritmo incluido en el módulo EDA del programa informático DeCyder v7,0. Las diferencias fueron considerados estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

Los resultados del estudio porcino de I/R se presentaron como media \pm desviación estándar de la media. Se utilizó un análisis T-Student para la comparación de las medidas entre el grupo tratado y control cuando se trataba de un único tiempo. Para aquellas medidas que fueron realizadas a una semana y a un mes después del IAM, se realizó una ANOVA para medidas repetidas, seguida de un análisis posthoc HSD Tukey. Todos los cálculos estadísticos se realizaron usando SigmaPlot 12. Las diferencias fueron considerados estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. RESULTADOS 1: La Diabetes tipo-1 experimental induce alteración de proteínas cardíacas implicadas en apoptosis, hipertrofia, fibrosis y, fundamentalmente, en el metabolismo

En este trabajo se realizó un modelo de STZ-DM1 en ratas con o sin hipertensión asociada [ratas SHR (espontáneamente hipertensas)] con el objetivo de estudiar posibles efectos adicionales de ambas patologías en etapas tempranas y tardías. En estadios crónicos, las ratas SHR y STZ-DM1-SHR presentaron un aumento exacerbado de fibrosis y apoptosis en el corazón. Además, por proteómica presentaron un aumento de proteínas apoptóticas y de regulación del citoesqueleto, y una disminución de proteínas del metabolismo de la glucosa y FAs con respecto al grupo STZ-DM1, pero similar al SHR. Se encontraron 24, 53 y 53 proteínas alteradas, en STZ-DM1, SHR y STZ-DM1-SHR, respectivamente frente al control. Para esta tesis hemos recogido sólo los datos de la comparativa de STZ-DM1 frente a control.

4.1.1. La Diabetes tipo-1 crónica induce fibrosis en el miocardio

En nuestro modelo, las ratas STZ-DM1 presentaron en la semana 22, hiperglucemia (554 ± 28 mg/dl glucosa en sangre), proteinuria (1578 ± 314 µg/día) y menor peso corporal en comparación con las ratas control, según lo esperado.

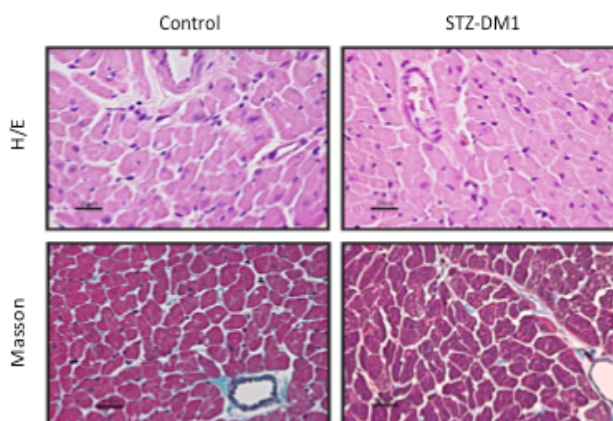


Figura 13. Cambios morfológicos en el miocardio de las ratas STZ-DM1. Tinción H/E y tricrómica de Masson (en azul se muestra la acumulación de MEC) en el miocardio control y STZ-DM1.

Tras aislar los corazones, las tinciones de Masson y H/E se utilizaron para examinar los cambios morfológicos en el septo interventricular miocárdico. Las ratas controles mostraron una estructura normal. Sin embargo, las ratas STZ-DM1 presentaron un aumento de la hipertrofia celular ($124,3 \pm 1,25\%$ vs. control) y de la deposición de MEC (Figura 13).

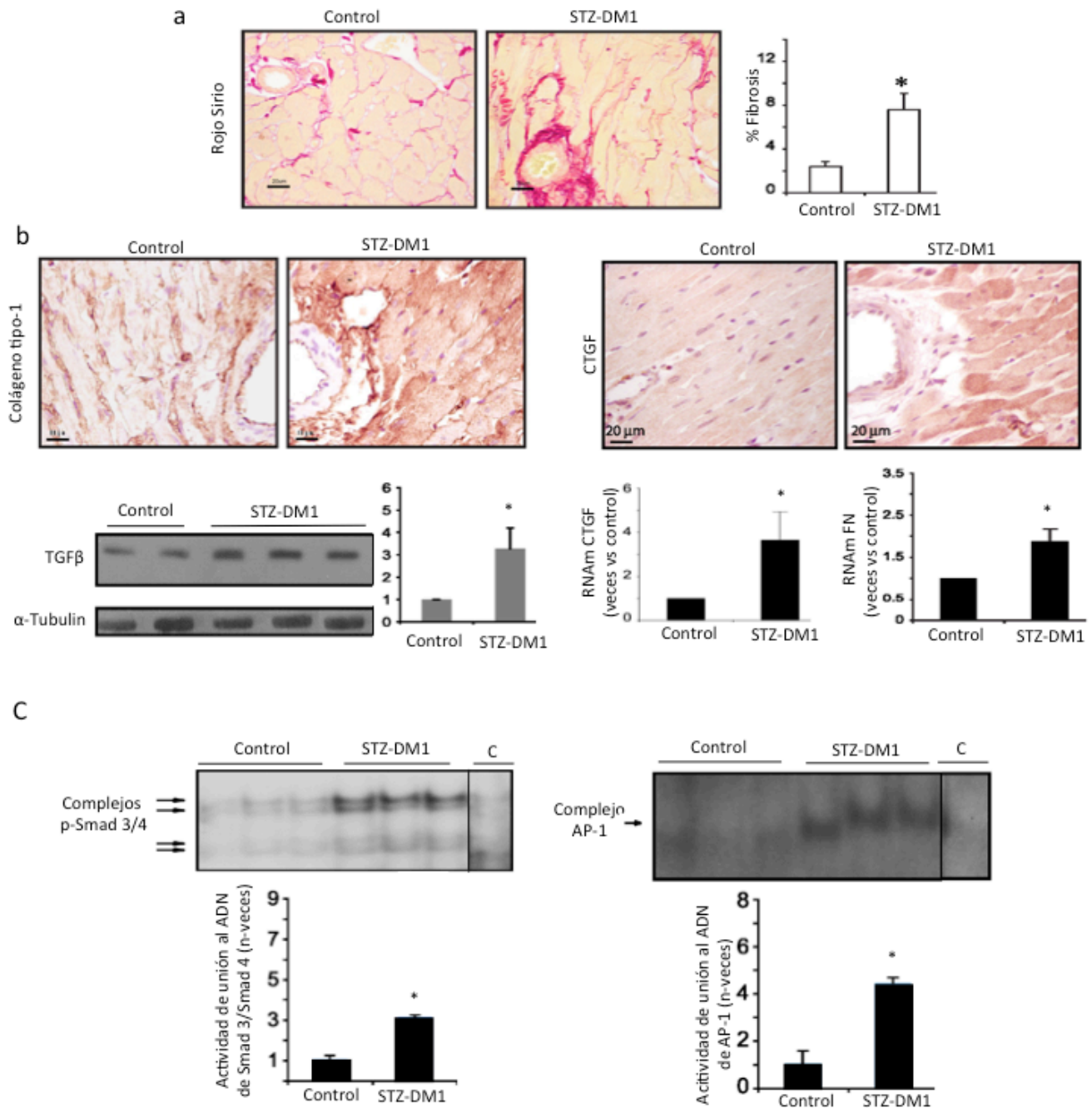


Figura 14. Fibrosis en el miocardio de las ratas DM1. (a) Tinción de rojo Sirio para la detección de las fibras de colágeno en el miocardio. (b) Inmunohistoquímica para colágeno tipo-I y para el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF). Expresión proteica de TGFβ y de ARNm de CTGF y de fibronectina (FN). (c) La actividad de unión al ADN de los complejos Smad 3/4 y AP-1 (flechas) se midió mediante EMSA. C: ensayo de competición (oligonucleotido no marcado). * $p < 0,05$ vs. control.

En este sentido, la semicuantificación de las áreas teñidas en rojo tras la tinción con Rojo Sirio revelaron un aumento en la deposición de colágeno en el miocardio de las ratas STZ-DM1 (7,5% vs. control), que fue principalmente intersticial y perivascular (Figura 14a). El sistema TGFβ es un mediador clave en el proceso de fibrosis a través de la regulación de la sobreexpresión de proteínas de MEC, como colágeno tipo-I o FN, producidos por las células

locales^{141,86}. TGF β se encontró también estimulado en el corazón STZ-DM1 (3,2 veces vs. control) (Figura 14b). La inmunohistoquímica para colágeno tipo-I y para CTGF, mediador conocido del sistema TGF β , mostró un aumento de expresión de estas proteínas (Figura 14 b). Similares datos encontramos para la expresión de ARNm tanto de CTGF como de FN (3,6 y 1,8 veces vs. control, respectivamente) (14b). Además, estudiamos la participación de factores de transcripción ligados a la activación de TGF β , como Smads 3/4 y AP-1. Se observaron cuatro complejos para Smads y uno para AP-1 en extractos proteicos de miocardio y mediante un ensayo de competición con oligonucleótidos no marcados se demostró la especificidad de unión (Figura 14c, C). Significativamente, en el grupo STZ-DM1 detectamos un aumento de actividad de unión a ADN tanto para Smad 3/4 como para AP-1 (2,9 y 4,2 veces vs. control, respectivamente) (Figura 14c).

4.1.2. La STZ-DM1 crónica produce apoptosis celular cardiaca

Mediante la tinción de TUNEL en los corazones de las ratas observamos que el miocardio STZ-DM1 presentaba un aumento de células apoptóticas ($5,08 \pm 1,2\%$ vs. control) (Figura 15a). Los mecanismos de muerte celular no han sido específicamente descritos en DM1 crónica. En nuestro modelo, la expresión de FasL y de su receptor (Fas) estaba aumentada en STZ-DM1 (1,43 y 2,3 veces vs. control) (Figura 15b). Además, en relación a la apoptosis dependiente de la mitocondria, el ratio Bax (proteína proapoptótica) y Bcl-2 (proteína antiapoptótica) fue mayor en el miocardio STZ-DM1 (7 veces vs. control) (Figura 15c) así como la activación de la proteína apoptótica efectora, caspasa-3 (3,0 veces vs. control) (Figura 15d).

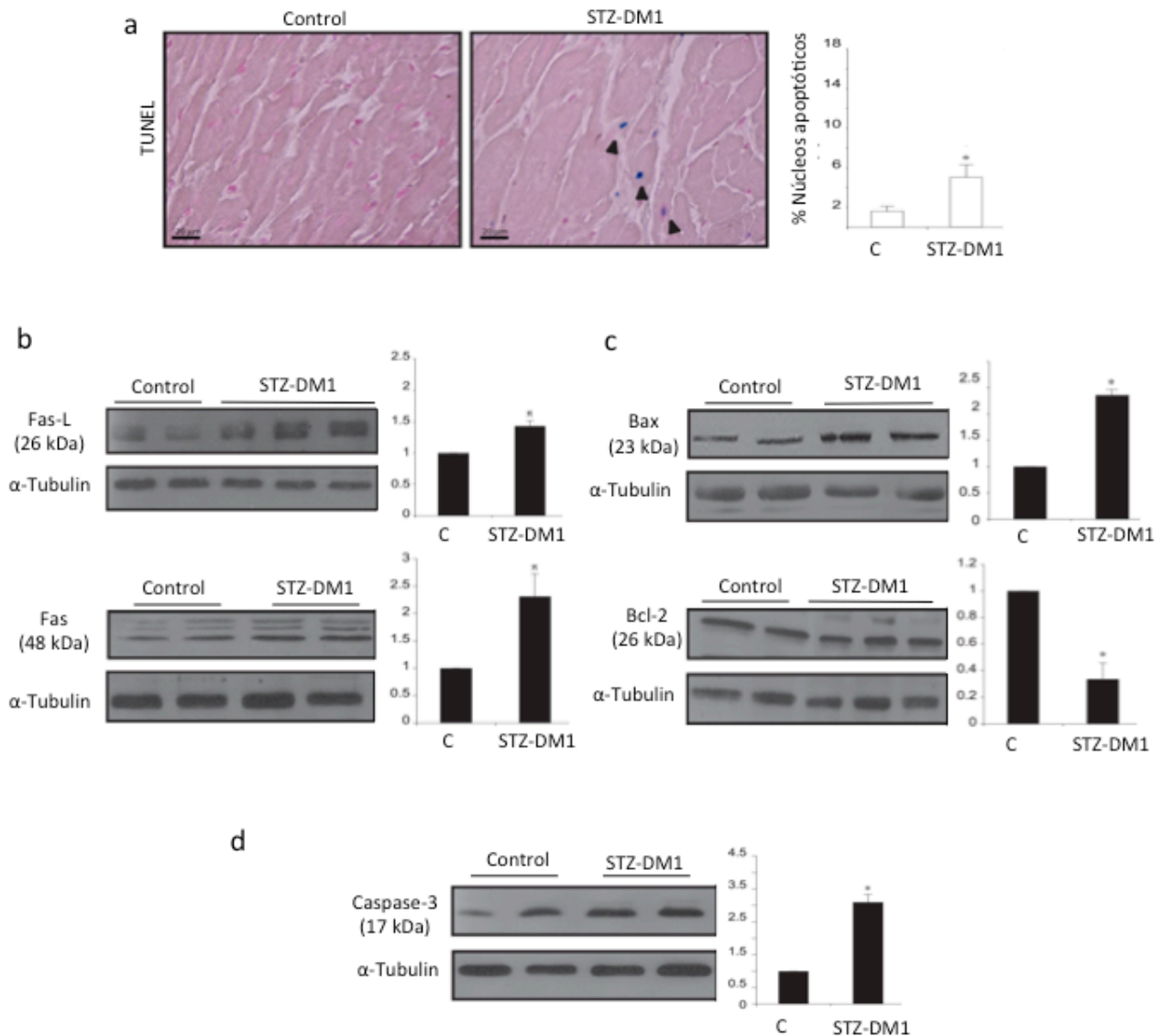


Figura 15. Apoptosis cardiaca en el miocardio STZ-DM1. (a) Ensayo de TUNEL para el marcaje de células apoptóticas (flechas). La semicuantificación de apoptosis celular mostrada como porcentaje de núcleos apoptóticos vs. núcleos totales (x100). Western blot para el estudio de la expresión de (b) Fas y Fas-L, (c) Bax y Bcl-2 y (d) caspasa-3 (activa). * $p < 0,05$ vs. control.

4.1.3. Expresión proteica diferencial en el miocardio STZ-DM1

Una vez caracterizado el modelo cardiaco de STZ-DM1 crónica, quisimos estudiar la implicación de proteínas diferencialmente expresadas que pudieran aportar información de las vías de señalización implicadas. El análisis con el programa DeCyder reveló cambios significativos en los niveles de 24 proteínas presentes en el corazón STZ-DM1 con respecto al control, 16 de ellas relacionadas con los eventos estudiados de MCD. Las moléculas diferencialmente expresadas y sus niveles de expresión están representados en la Tabla 5. En particular, tres de estas proteínas estaban vinculadas con la contracción y con la regulación del citoesqueleto. Los corazones STZ-DM1 mostraron un aumento significativo de desmina

(DES) ,de proteínas de unión a dominios LIM (LDB3) y con dominios PDZ y LIM (PDLIM) que podrían correlacionarse con el aumento de hipertrofia celular descrito.

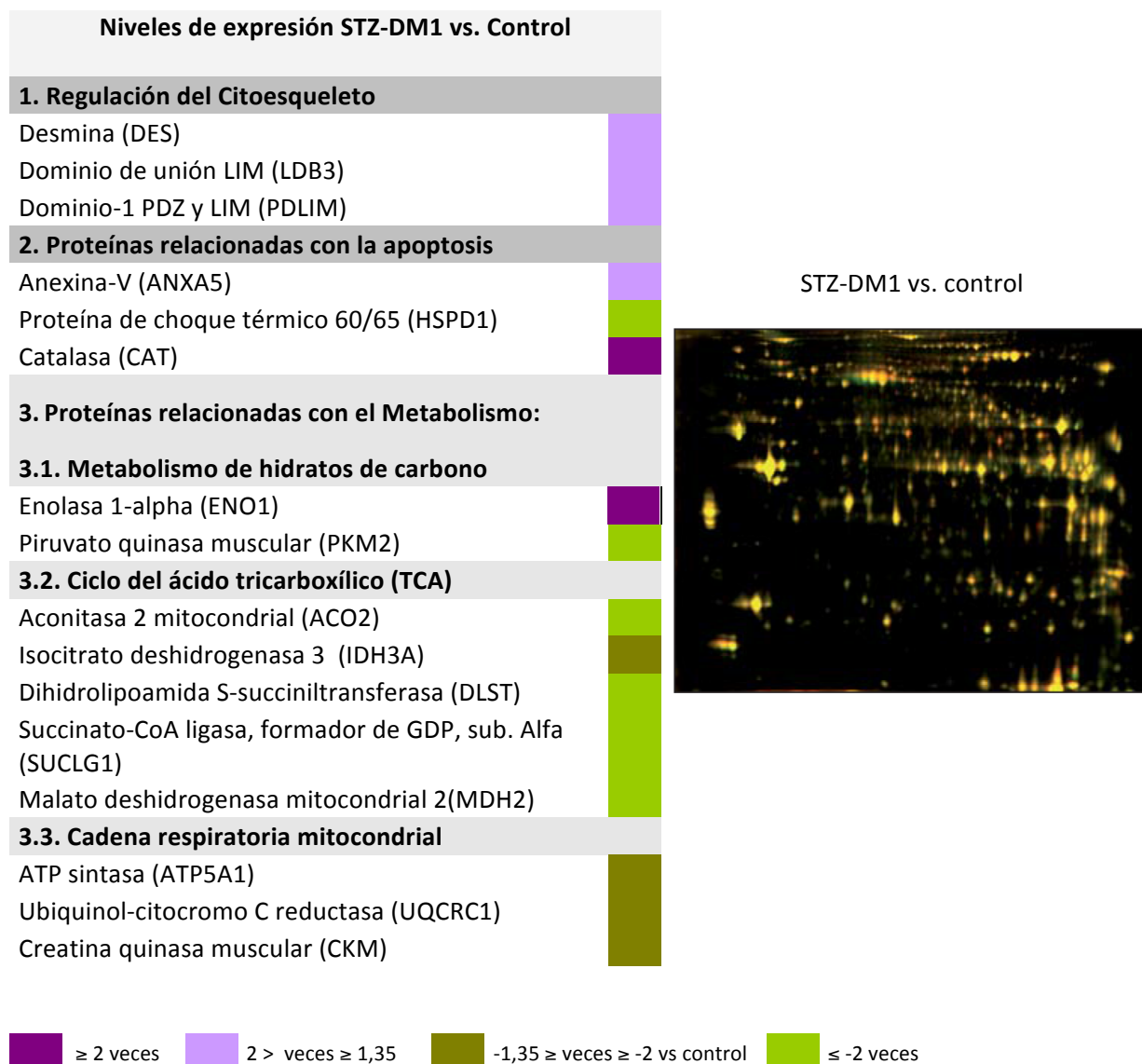


Tabla 5. Niveles de expresión proteica por proteómica 2D-DIGE. En STZ-DM1, 24 proteínas diferencialmente expresadas fueron observadas con respecto a control. Las proteínas fueron clasificadas en grupos según su función celular (GenCards®) en proteínas relacionadas con la regulación del citoesqueleto, con la apoptosis y proteínas metabólicas (hidratos de carbono, TCA y cadena respiratoria), y misceláneas (estas últimas no mostradas). El color representa su nivel de expresión. A la derecha, gel representativo 2D-DIGE en el que se observan las proteínas de los extractos proteicos STZ-DM1 y control marcados con fluoróforos Cy5 (rojo) y Cy3 (verde). En amarillo, superposición de colores.

Además, los niveles de la proteína proapoptótica y prohipertrófica anexina-V (ANXA5) estaban aumentados en el corazón STZ-DM1 mientras que los de la proteína antiapoptótica de choque térmico 60/65 (HSPD1) estaban reducidos, lo cual podría ser representativo del aumento de células apoptóticas. Por otro lado, la proteína antioxidante catalasa (CAT) estaba

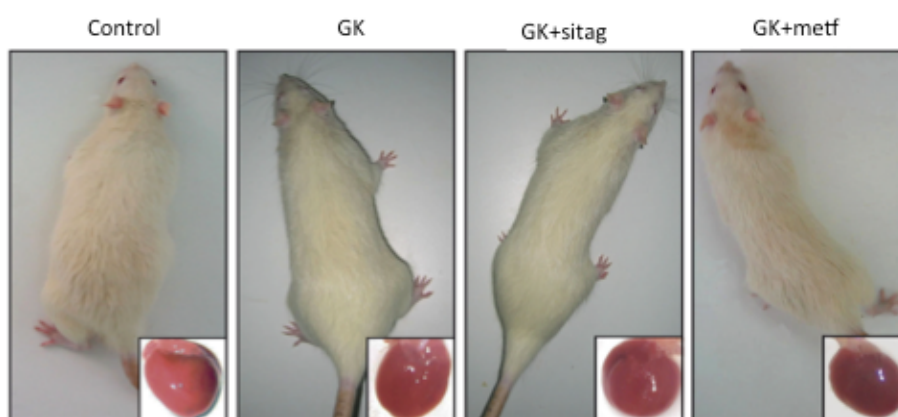
sobreexpresada en STZ-DM1 con respecto a control lo que podría vincularse con fenómenos de oxidación previamente descritos⁸². Sin embargo, no encontramos alteraciones significativas en la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de fibrosis. Las proteínas relacionadas con el metabolismo fueron el mayor grupo de proteínas alteradas, y con mayores variaciones, con respecto al control. Aunque la ENO1 estaba elevada en STZ-DM1, proteínas que participan más abajo en la vía metabólica de los hidratos de carbono como la PKM2 estaban disminuidas. Por otro lado, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) podría estar también reducido en los miocardios STZ-DM1. Estos presentan una disminución de ACO2, IDH3A, DLST, SUCLG1 y MDH2. La cadena respiratoria mitocondrial también se vio afectada en los corazones de las ratas STZ-DM1. De hecho, se observó una reducción de la expresión de ATP5A1 y de UQCRC1, un componente del complejo-III de la cadena respiratoria. Finalmente, la forma citosólica de la creatina quinasa transportadora de ATP (CKM) se encontró disminuida en los corazones STZ-DM1. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de las enzimas de la β -oxidación como por ejemplo proteínas de la acil-CoA sintetasa o la acil-CoA deshidrogenasa (no mostrado). Además, clasificamos un grupo de proteínas misceláneas cuya expresión también estaba alterada en el grupo STZ-DM1 (aldehído-deshidrogenasa mitocondrial (ALDH2), fosfoglicerato mutasa (PGAM2), dominio 1 de unión a zinc de la alcohol deshidrogenasa (ZADH1), hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT1), proteína similar a la hidroxisteroide deshidrogenasa (HSDL2), citovilina 2 (EZR), aminotransferasa mitocoldrial (BCAT2) (no mostrado).

En conclusión, esta primera parte de la tesis confirma que la fibrosis y la apoptosis cardíacas podrían ser procesos mantenidos en el tiempo a lo largo del desarrollo de la DM1. Además, especificamos nuevos factores apoptóticos extrínsecos, como el sistema Fas, y factores profibróticos como CTGF. Sin embargo, mediante proteómica, demostramos que la mayor cantidad de proteínas cuyos niveles estaban alterados en STZ-DM1 crónica, están vinculados con el metabolismo cardíaco. Concretamente, encontramos un desacoplamiento de la vía glicolítica y reducción del metabolismo mitocondrial, sin alteración de la β -oxidación, que podría ser causante de la deficiencia en la producción energética.

4. 2. RESULTADOS 2: La sitagliptina reduce la apoptosis, hipertrofia y fibrosis cardiaca en diabetes tipo-2 experimental, mayoritariamente a través de mecanismos dependientes de insulina. Potencial papel de las isoformas de GLP-1

Con el fin de investigar las acciones de las incretinas sobre el miocardio DM2, estudiamos el efecto de la administración de un inhibidor de la DPP-4 en ratas GK (no hipertensas ni obesas).

4.2.1. La sitagliptina y la metformina disminuyeron la hiperglucemia y la hiperlipemia en ratas GK



Peso corazón	453,8±35,57	401,7±24,66 **	374,11±28,43 †	367,70±18,33 †
PC/LF (X1000)	0,44±0,02	0,49±0,05 *	0,43±0,02 †	0,43±0,04 ††
Plasma:				
Glucosa (mg/dL)	204,42±40,31	531,71±94,53 **	337,71±89,82 ††	357,14±54,37 †
Ch (mg/dL)	55,57±11,84	93,0±15,45 **	63,42±17,33 ††	61,42±11,87 †
TG (mg/dL)	65,14±2,27	129,42±71,32 *	79,85±18,61 †	92,14±34,35
LDL (mg/dL)	20,42±3,73	25,34±14,34	17,14±7,15	12,60±3,57 †
Ch No-HDL (mg/dL)	33,57±2,14	51,14±11,99 **	33,14±5,87 ††	31,14±5,55 †
NEFA (mM)	0,24±0,12	0,69±0,34 **	0,73±0,28	0,73±0,29
HDL (mg/dL)	22,0±10,42	41,85±10,82 *	30,28±12,56	30,28±9,38
Proteinuria (mg/dL)	2,3±1,96	19,3±9,99 **	8,71±3,93 ††	7,18±3,32 †
Presión Sistólica (mmHg)	117,23±7,78	135,46±9,36	139,35±10,33	131,60±5,60

Figura 16. La sitagliptina y la metformina redujeron el ratio PC/LF, hiperglucemia, hiperlipemia y proteinuria en ratas GK. Evaluación de parámetros físicos y plasmáticos en las ratas (n=10, cada grupo). Imágenes representativas de las ratas y de los corazones para cada grupo. PC, peso del corazón; LF, longitud del fémur; Ch, colesterol; TG, triglicéridos; LDL y HDL, lipoproteínas de baja y alta densidad; NEFA, ácidos grasos no esterificados. * p < 0,05 y ** p < 0,01 vs. wistar. † p < 0,05 y †† p < 0,01 vs. GK.

En la semana 26, las ratas GK presentaron niveles circulantes elevados de glucosa y perfil lipídico [colesterol (Ch), triglicéridos (TG), colesterol no HDL, ácidos grasos no esterificados (NEFA) y colesterol HDL (HDL)], además de proteinuria, en comparación con el grupo control.

Además, en este grupo de ratas el ratio entre el peso del corazón y la longitud del fémur (PC\LF) estaba aumentado (Figura 16). Sin embargo, tanto la sitagliptina como la metformina atenuaron la hiperglucemia, hiperlipemia y proteinuria, y restauraron el PC\LF. Los iones plasmáticos (Na^+ , Cl^- and K^+), marcadores de daño renal severo (urea, la urea nitrogenada sanguínea, la creatinina y la albúmina), marcadores de daño hepático severo (ASAT y ALAT) (no mostrado) y presión arterial, permanecieron en rangos normales en todos los grupos de ratas (Figura 16).

4.2.2. La sitagliptina disminuyó el grosor de las paredes del VI y la hipertrofia celular en el miocardio GK

Por Eco-Doppler, las ratas GK mostraron un incremento significativo del grosor de la PPVI y del IMVI, en correlación con una disminución de los DDVI y DSVI. El tiempo de deceleración estaba prolongado lo que sugirió la existencia de disfunción diastólica en las ratas GK, y existía además una elevación de la FEVI (Figura 17a). El tratamiento con sitagliptina redujo significativamente el grosor de la PPVI, el IMVI y el tiempo de deceleración. El tratamiento con metformina también produjo de manera similar una disminución del tiempo de deceleración y una tendencia no significativa hacia la restauración del grosor de PPVI y del IMVI (Figura 17a). Además, tras el sacrificio, realizamos la medida histológica del grosor de las paredes del corazón a partir de una tinción con H/E y confirmamos el aumento del grosor de la PPVI en el miocardio GK y su disminución con el tratamiento con sitagliptina, pero no con metformina (Figura 17b). Además medimos los diámetros de los cardiomiocitos en la zona de la PPVI. Las ratas GK mostraron un incremento significativo del área transversal de los cardiomiocitos ($1,41 \pm 0,04$ veces vs. control $p < 0,05$), mientras que se encontraba reducido en las ratas tratadas con sitagliptina ($1,14 \pm 0,09$ veces vs. control $p < 0,05$) (no mostrado).

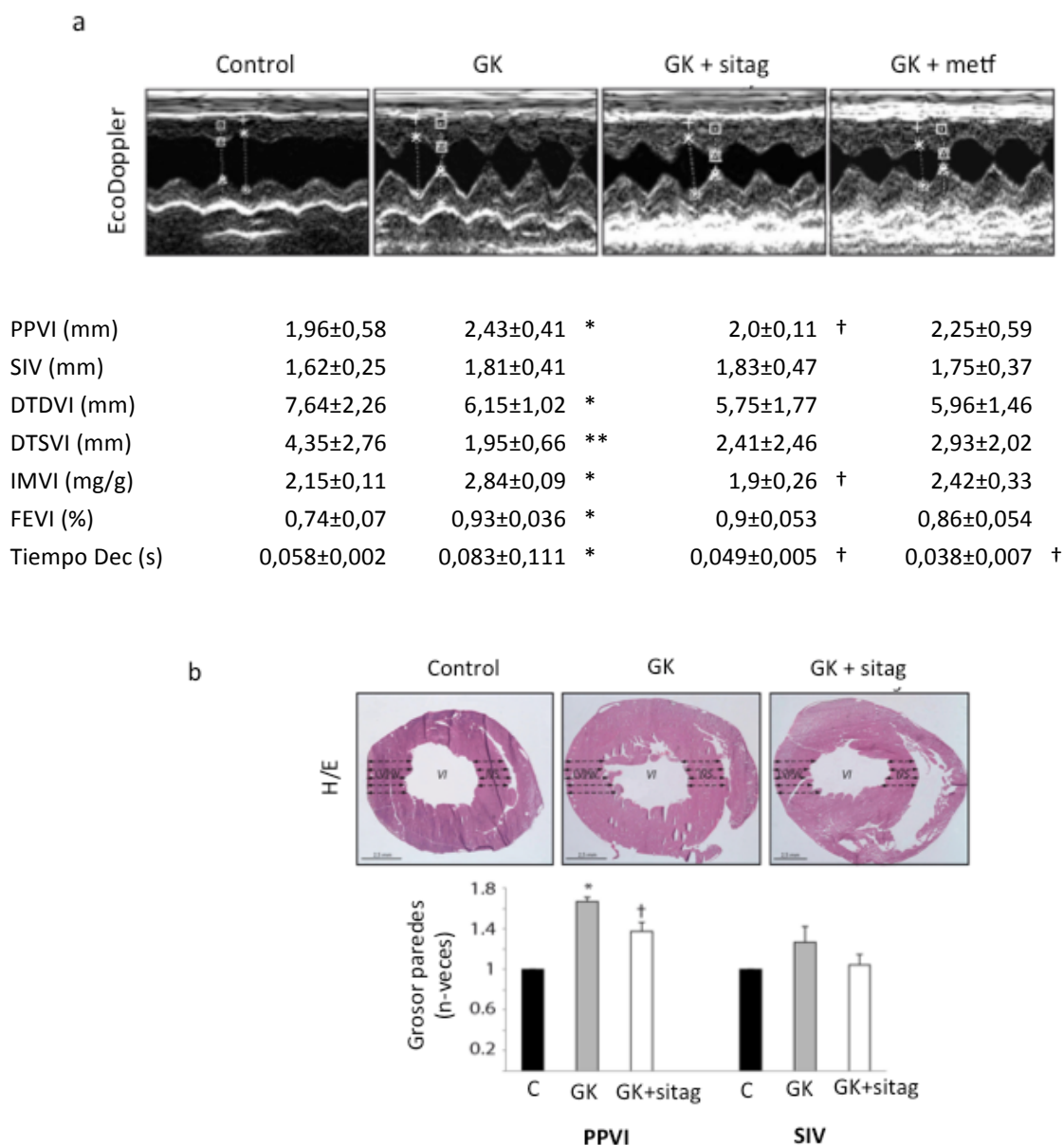


Figura 17. La sitagliptina redujo la hipertrofia cardiaca en ratas GK. (a) El grosor de la pared posterior del VI (PPVI) y del septo interventricular (SIV), los diámetro sistólico (DSVI) y diastólico (DDVI) del VI, el índice de masa del VI (IMVI), la fracción de eyección (FEVI) y el tiempo de deceleración fueron determinados en todos los animales. Se muestran imágenes representativas de la ecocardiografía. **(b)** Tinción de Hematoxilina/Eosina de secciones transversales de los miocardio, con su correspondiente medida de grosor de la PPVI y del SIV. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs. control. † $p < 0,05$ vs. GK.

4.2.3. El tratamiento con sitagliptina redujo la fibrosis y la hipertrofia del VI en ratas GK

El miocardio de las ratas control presentó una arquitectura homogénea con un espacio intersticial normal (Figura 18a). Por el contrario, el miocardio GK mostró una estructura anormal con un aumento del espacio intersticial y una disposición de los cardiomiocitos desorganizada.

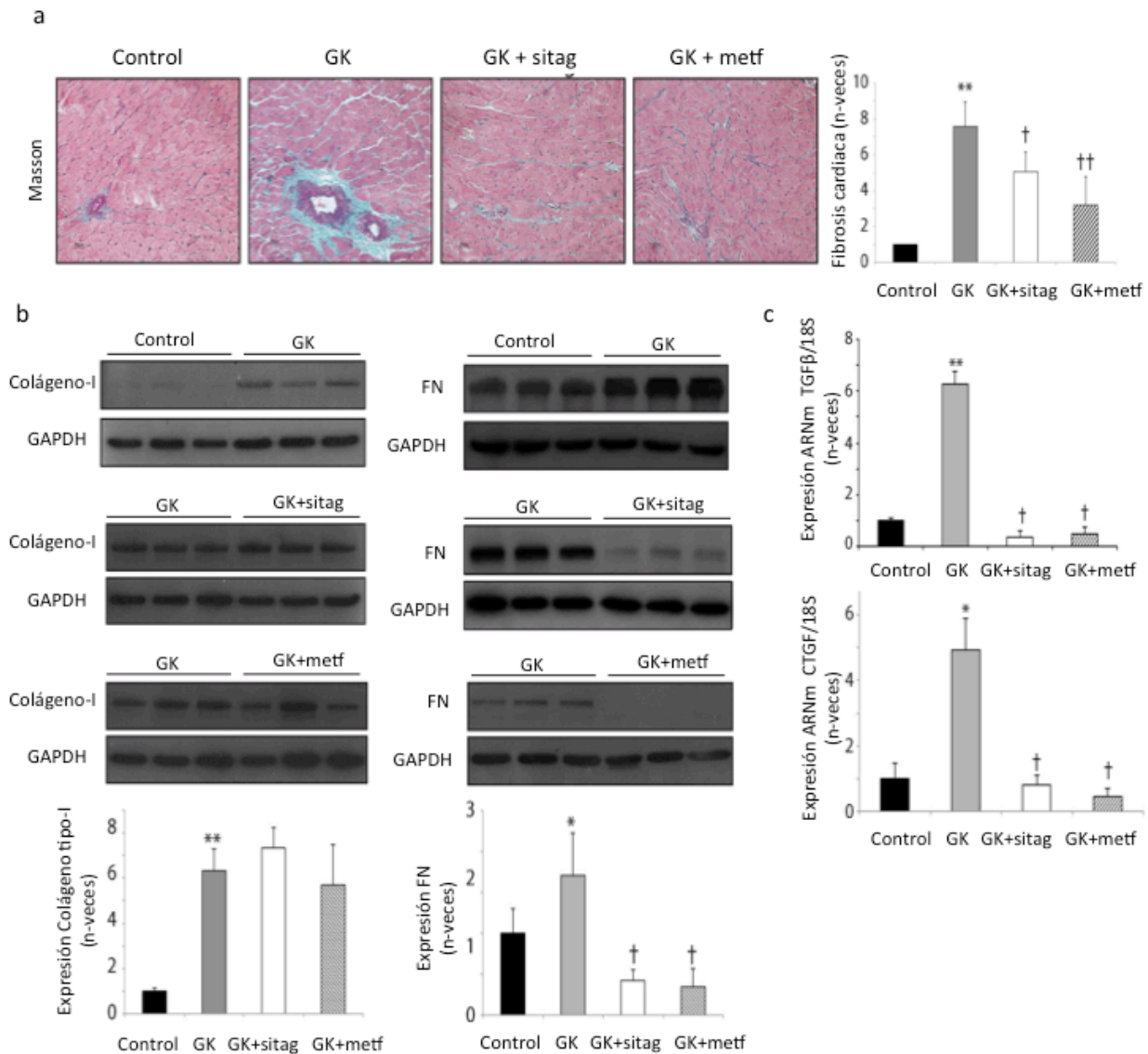


Figura 18. Sitagliptina y metformina redujeron el acúmulo de MEC en el miocardio GK. (a) Tinción tricrómica de Masson en los miocardios control, GK y GK tratadas con sitagliptina o metformina, en los que se observa la deposición de MEC (tinción azul verdosa) (n=10, cada grupo) **(b)** Niveles de expresión proteica de pro-colágeno tipo-I (Colágeno-I) y fibronectina (FN) y factores profibróticos, TGFβ y CTGF (n=10, cada grupo). * p < 0,05 y ** p < 0,01 vs. control. † p < 0,05 y †† p < 0,01 vs. GK.

Además, en el grupo GK se indujo deposición de MEC intersticial y perivascular. Tanto el tratamiento con sitagliptina como con metformina disminuyó la acumulación de MEC y la sobreexpresión de FN, TGFβ y CTGF (Figura 18 b y c). Por ello, continuamos nuestros estudios *in vitro* con el análisis de la expresión de FN en las células cardíacas.

4.2.4. La sitagliptina y la metformina disminuyeron la muerte celular del VI en ratas GK

Mediante TUNEL observamos un incremento significativo de muerte celular en el miocardio de las ratas GK ($142 \pm 5,5\%$ vs. control, $p < 0,05$).

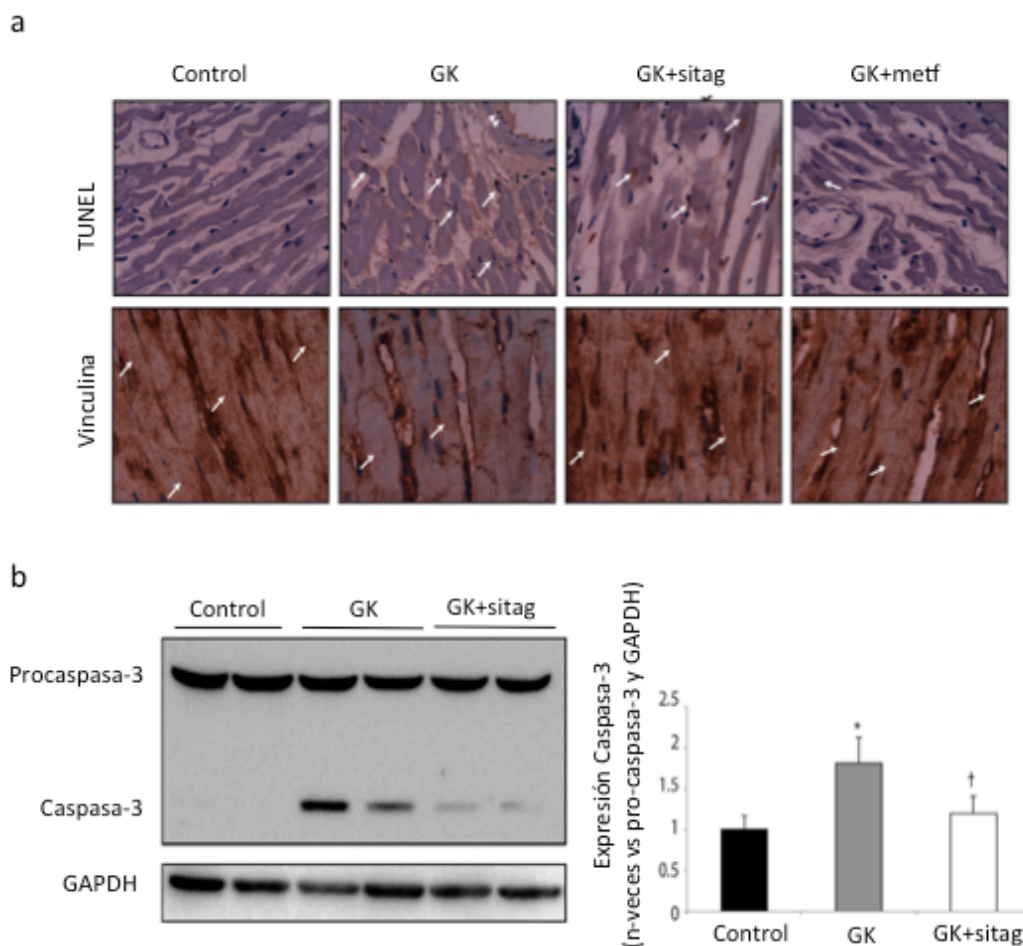


Figura 19. La sitagliptina y la metformina redujeron la muerte celular en el miocardio GK. (a) Detección de células apoptóticas por TUNEL en el miocardio (flechas) y en la vasculatura del corazón (cabezas de flechas). Tinción celular de vinculina (abajo). **(b)** Expresión proteica de caspasa-3. * $p < 0,05$ vs. control. † $p < 0,05$ vs. GK.

La apoptosis fue detectada en cardiomiocitos, fibroblastos y células vasculares (principalmente células endoteliales) (Figura 19a). La expresión de caspasa-3, proteína apoptótica efectora, estaba incrementada en el miocardio de estas ratas (Figura 19b). Por otra parte, las células necróticas fueron identificadas por la pérdida de vinculina, una proteína del citoesqueleto marcadora de viabilidad celular (Figura 19a). Tanto la sitagliptina como la metformina redujeron tanto el número de células apoptóticas ($125,5 \pm 3,0\%$ y $98,3 \pm 5,2\%$ veces vs. control), como la expresión de caspasa-3 activa y de vinculina con respecto a GK (Figura 19 a y b).

4.2.5. La sitagliptina aumentó los niveles de GLP-1 en plasma de ratas GK tanto en ayuno como tras sobrecarga de glucosa

Datos previos habían indicado que el tratamiento con sitagliptina aumentaba los niveles de GLP-1 en plasma de pacientes DM2 de una manera dependiente de glucosa¹⁵². Para analizar los niveles de GLP-1 en el plasma de las ratas GK, realizamos un test de tolerancia a glucosa y observamos que, en ayunas (Figura 20, arriba, 0 min), los niveles de GLP-1 estaban muy reducidos en GK y moderadamente recuperados tras el tratamiento con sitagliptina lo que podría estar relacionado con los niveles de insulina circulantes (Figura 20).

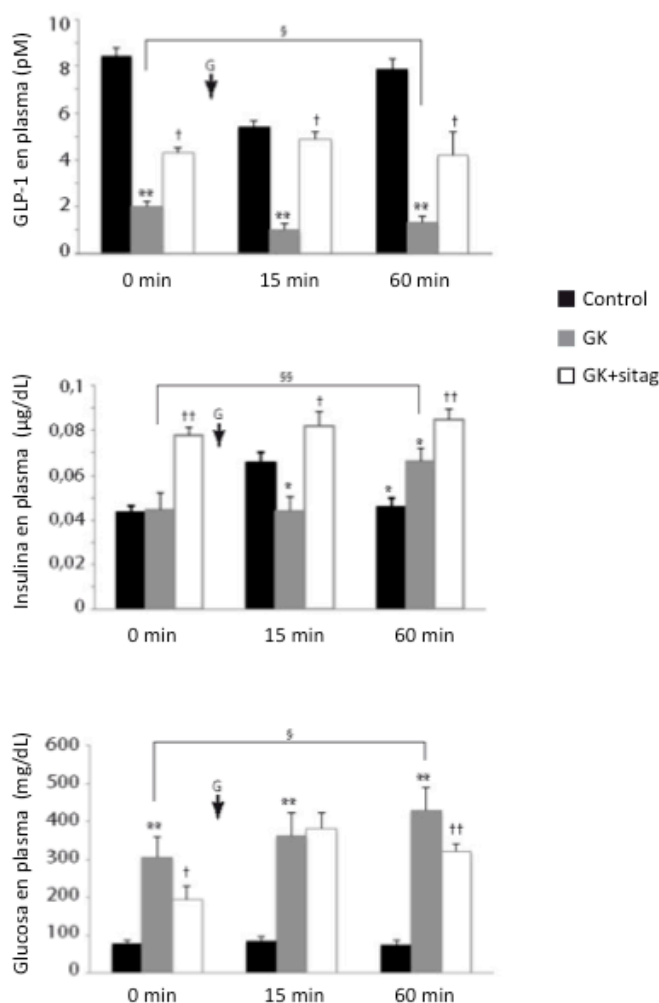


Figura 20. La sitagliptina mejoró la tolerancia a la glucosa en ratas GK. Se evaluó la concentración de GLP-1, insulina y glucosa en el plasma de las ratas antes (ayunas) y 15 y 60 minutos después de una sobrecarga de glucosa (n=10, cada grupo). * p < 0,05 y ** p < 0,01 vs. control. † p < 0,05 y †† p < 0,01 vs. GK. § p < 0,05 y §§ p < 0,01 vs. estado en ayunas.

Sin embargo, fue principalmente a los 60 minutos después de la sobrecarga de glucosa cuando los niveles presentaron unos niveles más bajos de GLP-1 y una respuesta insulínica retardada (Figura 20, arriba y medio), lo que podría ser responsable de los niveles

incrementados de glucosa en el grupo GK (Figura 20 abajo). Sin embargo, tras 60 minutos desde la sobrecarga, las ratas tratadas con sitagliptina mantuvieron mayores niveles de GLP-1 y de insulina, lo que podría conllevar el descenso significativo de la glucemia.

4.2.6. Expresión del receptor celular para GLP-1

La existencia de receptor de GLP-1 (GLP-1R) ha sido también descrita en tejidos extrapancreáticos como el corazón, concretamente en cardiomiocitos, pero no en fibroblastos⁸. Nosotros corroboramos la expresión de ARNm de GLP-1R en el VI de las ratas de nuestro modelo (Figura 21a, izquierda). Las ratas GK presentaron unos niveles de expresión significativamente mayores que los de las ratas control, y el tratamiento con sitagliptina no modificó esta expresión. Como era de esperar, al contrario que en fibroblastos cardiacos y TFB (no mostrado), sí detectamos expresión de RNAm GLP-1R en la línea celular HL-1 de cardiomiocitos. Dicha expresión no se modificaba después de 6 h de incubación con HF, HG o GLP-1 (Figura 21a, derecha). Así, la presencia de GLP-1R en el corazón de las ratas y en los cardiomiocitos en cultivo sugiere la acciones directas de GLP-1 sobre el miocardio.

4.2.7. GLP-1 regula la fibrosis, hipertrofia y apoptosis inducidas por HF y/o HG en cardiomiocitos en cultivo

El exceso de FAs y de glucosa son los componentes principales en la MCD^{3,56}. Nosotros estimulamos cardiomiocitos HL-1 con ambos factores y analizamos la respuesta fibrótica celular. Después de 24 h de incubación, HF y HG aumentaron la expresión de fibronectina [Figura 21b , por IF (arriba) y WB (abajo)] y su secreción al medio de cultivo (Figura 21c). Cuando añadimos ambos factores no se produjo un efecto adicional o sinérgico (no mostrado). De acuerdo con estos datos, la expresión de ARNm de citoquinas profibróticas, TGF β y CTGF, también estaba incrementada tras 6 horas de estimulación con HF y HG (Figura 21d).

Debido a que la sitagliptina aumentó los niveles de GLP-1 en plasma (Figura 20) y redujo la fibrosis en ratas GK (Figura 18), investigamos si GLP-1 podría modular la respuesta profibrótica desencadenada por HG y HF en los cardiomiocitos.

4. Resultados 2

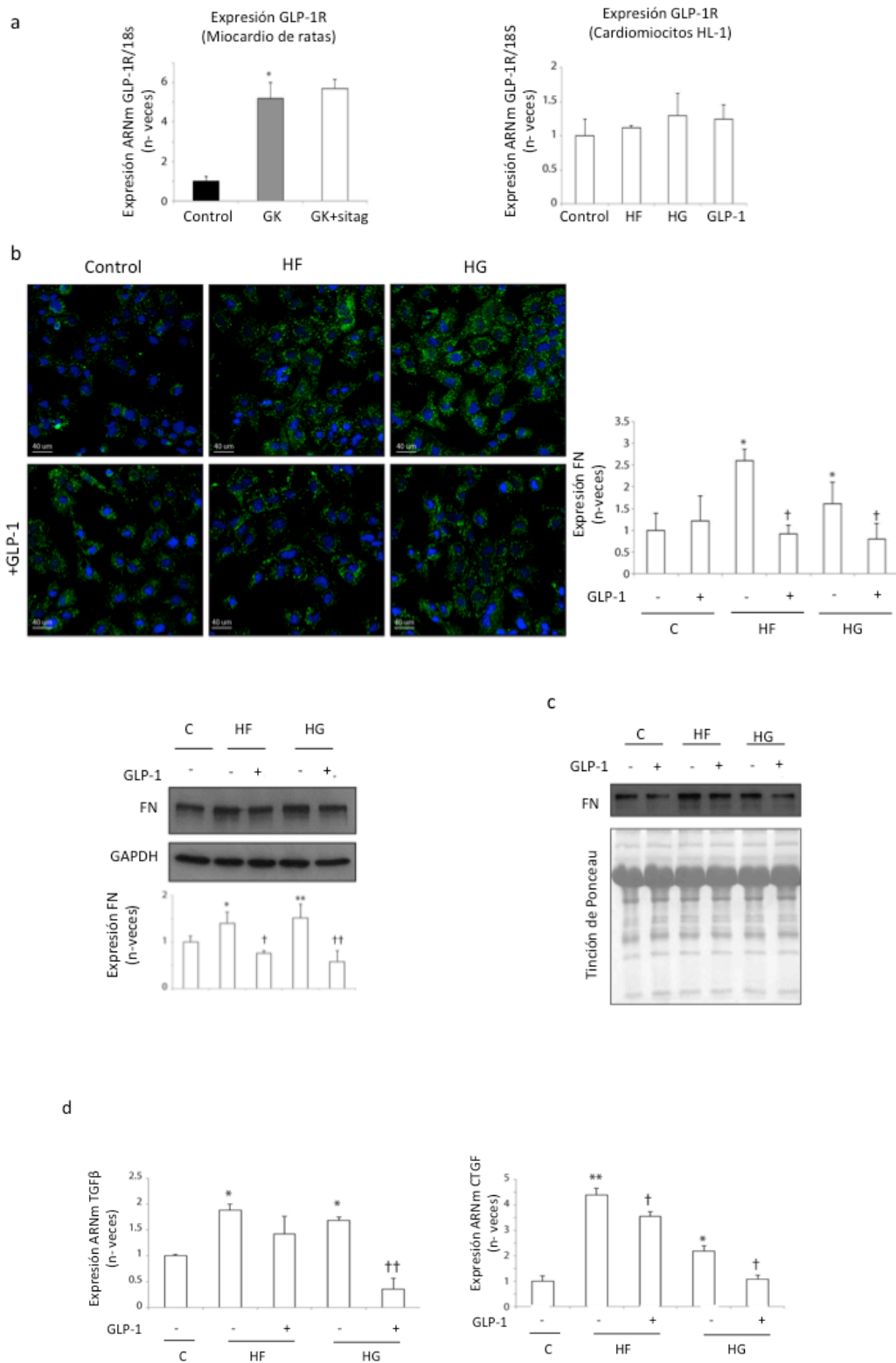


Figura 21. Presencia de GLP-1R en el corazón y regulación de factores profibróticos por GLP-1. (a) Expresión de GLP-1R en el miocardio de las ratas (n=5, cada grupo) (izquierda) y en cardiomiocitos HL-1 estimulados (derecha). (b) Niveles de expresión de fibronectina (FN) intracelular (por inmunofluorescencia y por western blot) y (c) secretada al medio de cultivo celular. (d) Expresión RNAm de TGFβ y CTGF en cardiomiocitos. * p < 0,05 y ** p < 0,01 vs. control. † p < 0,05 y †† p < 0,01 vs. HF o HG.

El pretratamiento con GLP-1 (1nM) atenuó la expresión de FN [Figura 21b , por IF (arriba) y WB (abajo)] y su secreción (Figura 21c) en células estimuladas con HG o HF. GLP-1 solo no alteró el contenido de FN en células control (Figura 21b). Por otra parte, estudiamos el efecto de HG, HF y GLP-1 sobre la hipertrofia y sobre la muerte celular cardiaca. Tras 24 h, la estimulación con HF produjo un incremento del tamaño celular ($167.4 \pm 13.1\%$ vs. control; Figura 22, arriba) y del péptido natriurético cerebral (BNP) (Figura 22, abajo). HG también produjo un incremento de la hipertrofia de los cardiomiocitos ($183.0 \pm 9.4\%$ vs. control; Figura 22, arriba) y un aumento de BNP y de la proteína de músculo liso α -actina (α -SMA) (Figura 22, abajo).

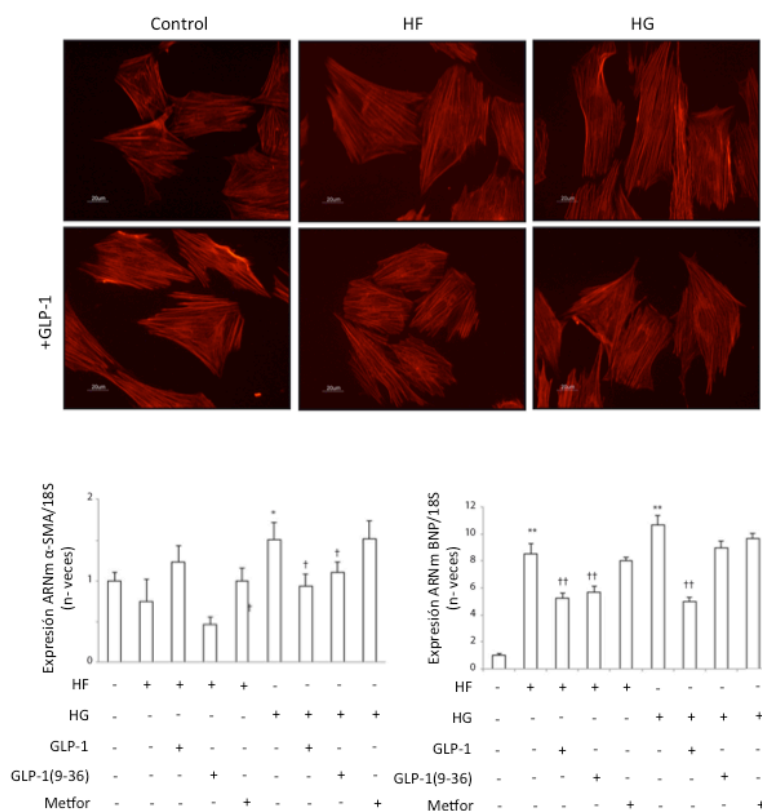


Figura 22. Las isoformas de GLP-1 reducen la respuesta hipertrófica de los cardiomiocitos cuando son estimuladas con HF o HG. Cardiomiocitos pretratados con GLP-1 y estimulados con HF o HG. Inmunofluorescencia para la detección de α -actina (rojo) y posterior cuantificación del tamaño celular. Abajo, expresión de ARNm de BNP y de α -SMA. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs. control. † $p < 0,05$ y †† $p < 0,01$ vs. HF o HG.

Además, sólo HF indujo la muerte en los cardiomiocitos y en los fibroblastos cardiacos ($145.2 \pm 7.8\%$ y $136.9 \pm 4.3\%$ vs. control, respectivamente. Figura 23a), en correlación con un aumento de la expresión de caspasa-3 y de la liberación de dehidrogenasa glucose 6-fosfato (G6PD), un marcador de necrosis celular (Figura 23b).

4. Resultados 2

De manera ineteresante, el pretratamiento con GLP-1 mitigó la hipertrofia de los cardiomiocitos inducida por HF y HG (97.2±7.5% y 94.3±6.9% vs. HF y HG, respectivamente) y la muerte de los cardiomiocitos y fibroblastos inducida por HF (123.6±8.3% y 115.2±6.3% vs. HF, respectivamente), así como la expresión de marcadores hipertróficos, apoptóticos y necróticos (Figuras 22 y 23).

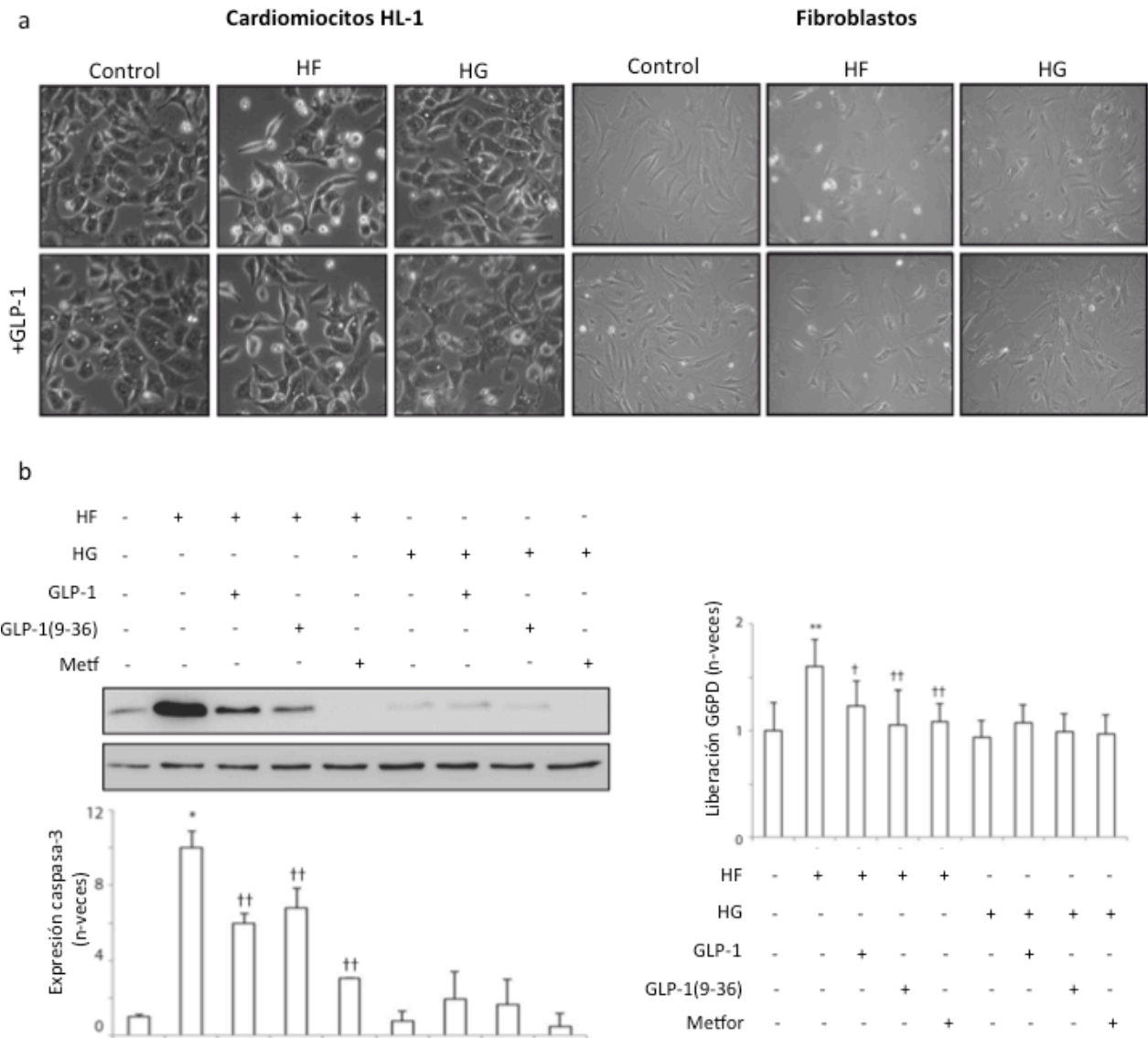


Figura 23. Las isoformas de GLP-1 alivian la respuesta letal de las células cardiacas cuando son incubadas con HF o HG. (a) Imágenes con microscopio óptico de los cardiomiocitos HL-1 y fibroblastos en cultivo tras su estimulación con HF o HG y pretratamiento con GLP-1. **(b)** Expresión de caspasa-3 celular y liberación de G6PD al medio de cultivo en cardiomiocitos. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs. control. † $p < 0,05$ y †† $p < 0,01$ vs. HF o HG.

4.2.8. El péptido GLP-1(9-36) presentó similares efectos cardioprotectores que GLP-1

GLP-1 no es producido por las células cardíacas^{94,156}. Sin embargo, en cardiomiocitos en cultivo, el GLP-1 exógeno puede ser convertido en GLP-1(9-36) por la acción de la DPP-4 cardíaca. Por ello, investigamos si los efectos cardioprotectores de GLP-1 previamente observados podrían ser consecuencia de la actividad de GLP-1(9-36).

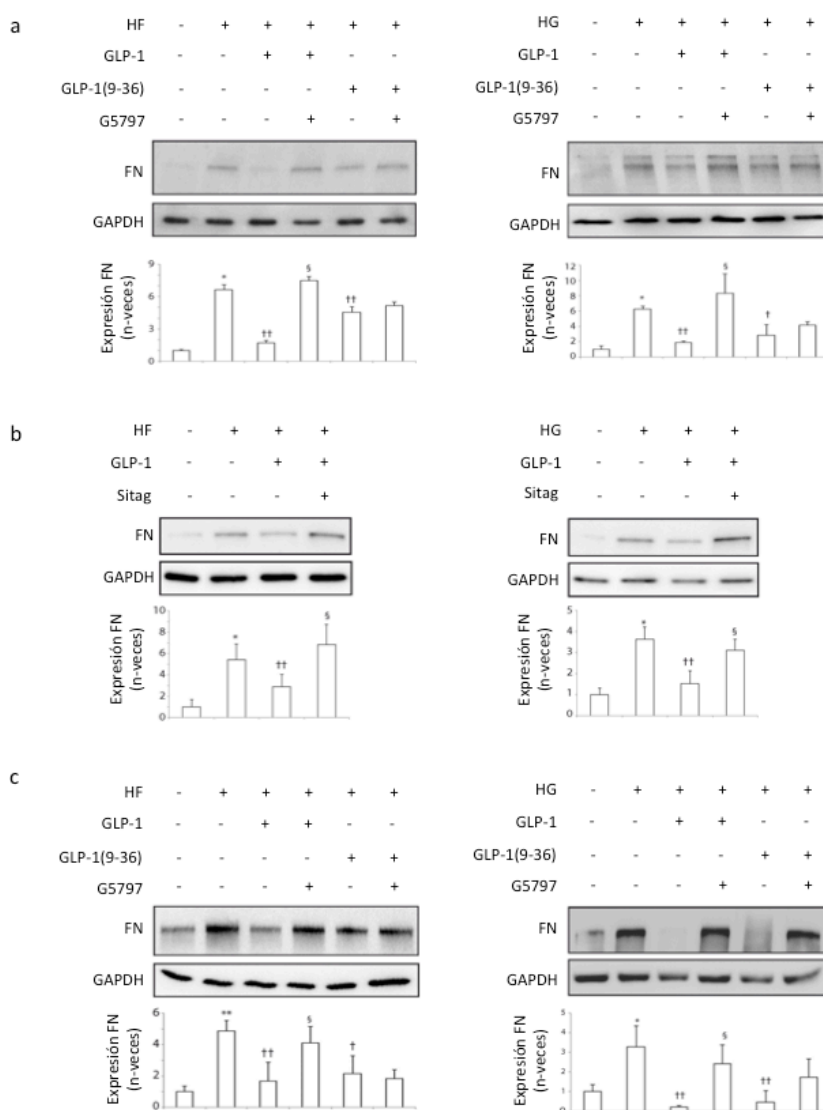


Figura 24. Efectos antifibróticos de GLP-1 y de GLP-1(9-36) en miocitos y fibroblastos cardíacos. Implicación de PPAR δ . (a) Niveles de expresión de fibronectina (FN) en cardiomiocitos pretratados con GLP-1 o GLP-1(9-36) expuestos a HF (izquierda) o HG (derecha). Algunas células fueron además incubadas con un antagonista de PPAR δ (G5797). (b) Expresión de FN en cardiomiocitos pretratados con sitagliptina. (c) La expresión de FN también fue evaluada en fibroblastos cardíacos. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs. control. † $p < 0,05$ y †† $p < 0,01$ vs. HF o HG. § $p < 0,05$ y §§ $p < 0,01$ vs. HF+GLP-1 o HG+GLP-1.

Curiosamente, igual que GLP-1, GLP-1(9-36) redujo la expresión de caspasa-3, G6PD (Figura 23b), BNP y α -SMA (Figura 22) y fibronectina (Figura 24a) en cardiomiocitos estimulados con HF o HG. Además, el efecto antifibrótico de GLP-1 fue revertido por el pretratamiento con sitagliptina confirmando el efecto directo de GLP-1(9-36) (Figura 24b). Además, aunque los fibroblastos no expresaban GLP1-R (nuestros datos y Ban K, y colaboradores⁸), comprobamos que sí respondían a la estimulación con las dos isoformas de GLP-1. HF o HG aumentaron la expresión de fibronectina y, tanto GLP-1 como GLP-1 (9-36) redujeron estos niveles. (Figura 24c). Asimismo, en cardiomiocitos de la línea celular H9C2 no detectamos expresión de GLP-1R pero también, encontramos una respuesta celular similar (no mostrado). Es posible que existan en el miocardio otros receptores distintos de GLP-1R afines a las isoformas de GLP-1.

4.2.9. PPAR β/δ como mediador del efecto antifibrótico de GLP-1

Un posible mediador de señalización a partir de la activación de GLP-1R podría ser PPAR β/δ ^{2,100}. En el miocardio de ratas GK se detectó un descenso de los niveles de PPAR δ , que fue normalizado con el tratamiento con sitagliptina, y no metformina (Figura 25a). Puesto que el efecto antifibrótico de PPAR β/δ en el corazón ya ha sido demostrado^{143,159}, pero su papel en el escenario de la MCD aún no era conocido, estudiamos si la activación de PPAR β/δ podría modular la expresión de FN inducida por HF o HG. Curiosamente, el pretratamiento con un agonista de PPAR β/δ (GW0742) atenuó los niveles de FN únicamente en los cardiomiocitos tratados con HG (Figura 24a). Además, el efecto antifibrótico de GLP-1, pero no de GLP-1(9-36), estaba significativamente disminuido cuando se pretrataba las células con un antagonista de PPAR β/δ (G5797) (Figura 24a). En los experimentos con fibroblastos cardiacos obtuvimos similares resultados (Figura 24c).

4.2.10. Efectos protectores directos de la metformina en células cardiacas

Debido a que sitagliptina y metformina reducen de manera similar la fibrosis en el corazón de las ratas GK, y GLP-1 estimula la actividad antifibrótica en cardiomiocitos y fibroblastos cardiacos, investigamos si la metformina podría también inducir un efecto antifibrótico directo en células cardiacas. Mediante western blot, observamos una reducción de la sobreexpresión de FN en cardiomiocitos (no mostrado) y en fibroblastos TFB (Figura 25d) estimulados con HG pretratados con metformina. Además, un conocido mediador de la acción de la metformina en la MCD¹⁵⁵, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), estaba también activado (fosforilado) en células estimuladas con HG.

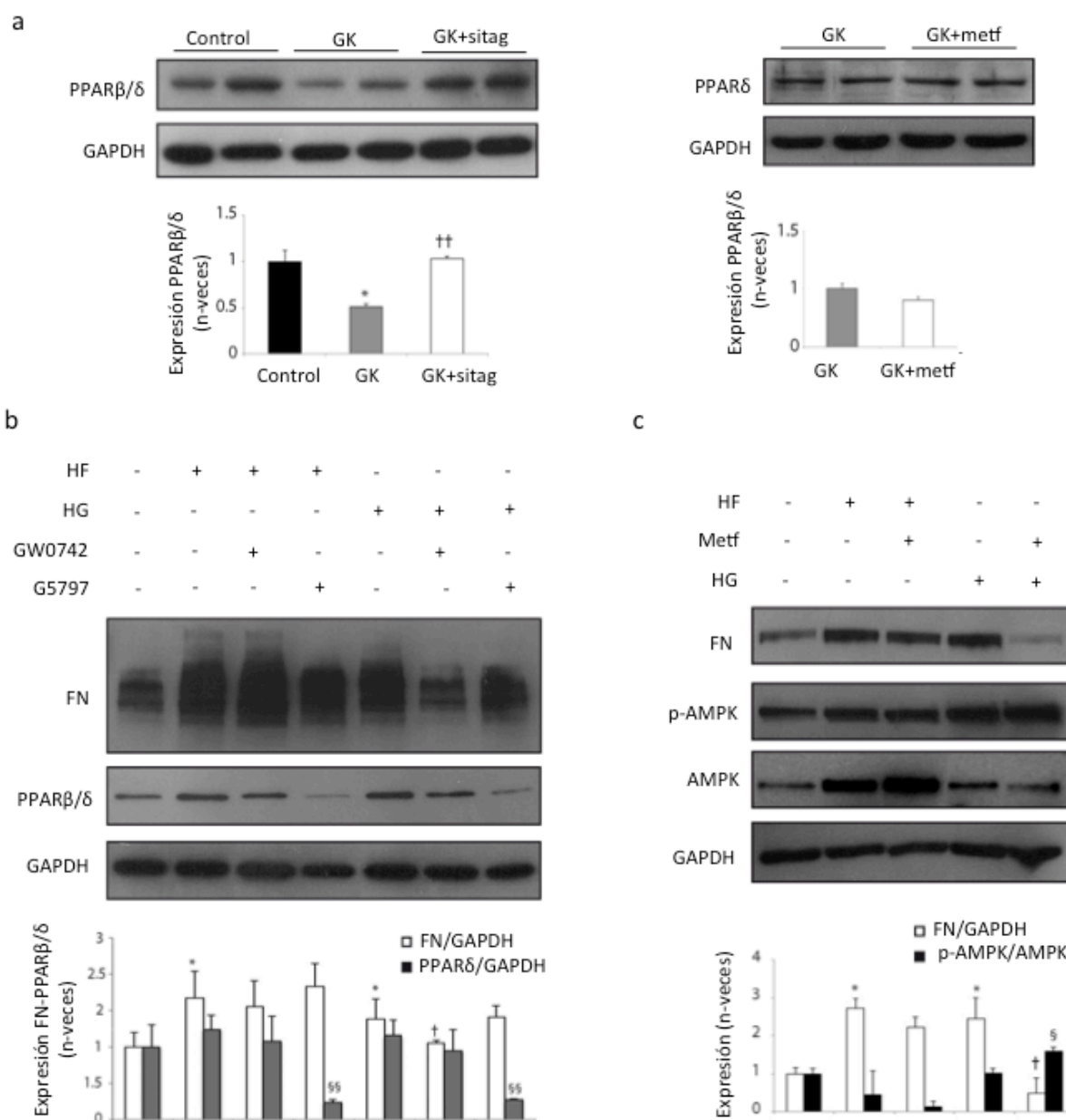


Figura 25. Regulación de FN por PPAR β/δ y metformina. Blots representativos de los niveles de PPAR δ en ratas control, GK, GK+sitag y GK+metf (**a**). (**b**) Expresión de fibronectina (FN) y PPAR δ en cardiomiocitos pretratados con un agonista (GW0742) o antagonista (G5797) de PPAR β/δ . * $p < 0,05$ vs. control y †† $p < 0,01$ vs. GK. § $p < 0,01$ vs. HF o HG. (**c**) Expresión de FN en fibroblastos cardiacos tratados. Niveles proteicos de FN, p-AMPK y AMPK en TFBs incubados con HF o HG y pretratados con metformina. * $p < 0,05$ vs. control, † $p < 0,05$ vs. HF o HG. § $p < 0,05$ vs. HG.

Sin embargo, la metformina no disminuyó los niveles de FN tras la estimulación con HF ni incrementó la fosforilación de AMPK, aunque sí la proteína total (Figura 25c). En este sentido se conoce que AMPK media también procesos de deacetilación en la biogenesis de la mitocondria¹⁵⁵. Finalmente, la metformina fue también capaz de reducir la expresión de

caspasa-3 y la liberación de G6PD (Figura 23b), aunque no la expresión de RNAm de BNP y α SMA en células estimuladas con HG o HF (Figura 22).

En conclusión, los estudios de esta segunda parte de la tesis indican que la sitagliptina podría ejercer un efecto cardioprotector dual, a nivel sistémico y mediante la acción directa de GLP-1 sobre las células cardíacas. Además, este trabajo revela el papel potencial activo de diferentes isoformas de GLP-1 como GLP-1(9-36) en el contexto de la MCD.

4.3. RESULTADOS 3: Papel cardioprotector de un agonista de GLP-1R en un modelo experimental de isquemia/reperfusión

Además de estudiar el efecto de la estimulación del sistema incretina en la MCD, evaluamos si este efecto podría extrapolarse en un modelo de I/R mediante la administración de un agonista de GLP-1R

4.3.1. Exenatida redujo el tamaño de infarto y mejoró la recuperación de miocardio

En nuestro modelo de I/R porcino, la administración de un agonista de GLP-1R, exenatida, dio lugar a una reducción del tamaño de infarto medido por RM mediante realce tardío de gadolinio (RTG) en comparación con el grupo control tanto a una semana como a un mes después del IAM. El índice de transmuralidad, otra medida del área infartada, fue significativamente menor en el grupo tratado, tanto a una semana como a un mes después del I/R (Tabla 6 y Figura 26a).

	1 Semana		1 Mes	
	Control	Exenatida	Control	Exenatida
Tamaño de infarto (RTG, % del VI)	39,6 ± 0,7	34,3 ± 1,3*	32,4 ± 1,3	26,8 ± 1,5**
Área en riesgo (% del VI)	41,3 ± 0,7	41,8 ± 0,7		
Miocardio recuperado (%)	4,2 ± 1,3	18,1 ± 3,0**		
Índice de transmuralidad	29,1 ± 1,0	24,4 ± 1,0**	26,3 ± 0,07	21,0 ± 1,5**
FEVI (%)	33,9 ± 0,8	39,9 ± 1,6*	33,8 ± 1,6	42,8 ± 2,2**
Volumen/latido del VI (ml)	29,5 ± 0,7	32,7 ± 0,7	38,1 ± 1,5	46,1 ± 2,6**
Tasa de eyección (ml/ms)	0,19 ± 0,02	0,30 ± 0,01**	0,21 ± 0,02	0,30 ± 0,02**
VTDVl (ml)	87,5 ± 3,7	82,8 ± 4,0	114,4 ± 7,2	110,6 ± 9,8
VTSVl (ml)	58,1 ± 3,1	50,1 ± 3,4	76,3 ± 6,3	64,5 ± 7,3
IMVl (g)	58,9 ± 2,7	52,6 ± 1,4*	70,6 ± 1,6	57,6 ± 1,7**

Tabla 6. Resultados de la RM cardiaca una semana y un mes después de un proceso de I/R en cerdos. * p < 0,05 y ** p < 0,01 vs. control.

Además, el tamaño del miocardio recuperado fue mayor con el tratamiento con exenatida que sin él (Tabla 6). El área en riesgo medida por RM cardiaca con secuencias ponderadas en T2 fue similar en ambos grupos, indicando que la diferencia observada en el

tamaño de la cicatriz no era resultado de diferencias en el tamaño de área en riesgo entre los dos grupos (Tabla 6, Figura 26b).

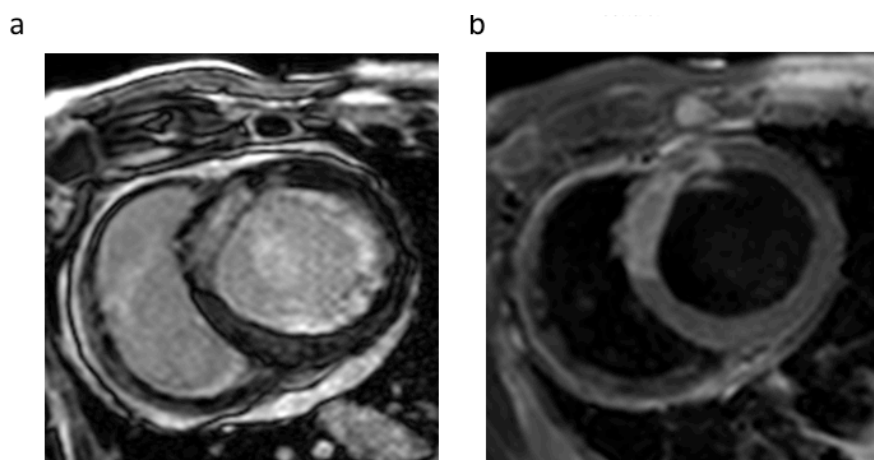


Figura 26. Determinación del tamaño de infarto y área en riesgo por RM. (a) Imagen representativa del eje corto obtenida por RM mostrando el realce tardío de gadolinio (área clara) una semana post-I/R para la medida del tamaño de infarto del VI. **(b)** Imagen representativa del eje corto de secuencias ponderadas en T2 por RM para la medida del área en riesgo del miocardio. Estas imágenes permiten la medida del edema miocárdico (área clara) que representa la zona de miocardio en riesgo.

La reducción del tamaño de infarto debido a la administración de exenatida estaba asociada con una mejora significativa de la función contráctil del VI (Tabla 6). Al cabo de una semana, la FEVI medida por RM en los animales tratados con exenatida fue 6% mayor en comparación con control (Tabla 6). Mientras que no hubo diferencias en la FEVI en el periodo comprendido entre una semana y un mes después de I/R en los cerdos control, la FEVI en el grupo tratado con exenatida mejoró aproximadamente un 3% a lo largo de ese mismo periodo de tiempo. Además, los cerdos tratados con exenatida se recuperaron mejor y presentaron una mejora en su FEVI incluso en la fase crónica tras I/R, momento en el cual el fármaco ya ha dejado de estar presente en la circulación (Tabla 6). De forma similar, el volumen por latido al cabo de un mes fue significativamente mayor en los animales tratados con exenatida, sin ninguna diferencia entre los dos grupos en el volumen al final de la diástole del VI (Tabla 6).

4.3.2. Evaluación de la función cardíaca por ecocardiografía

A nivel basal, la FEVI obtenida por ecocardiografía 3D fue similar en todos los animales demostrando que no había diferencias entre los dos grupos experimentales antes de iniciar la inducción del IAM (Tabla 7). Sin embargo, una semana y un mes después del procedimiento, la FEVI fue significativamente mayor en los cerdos tratados con exenatida en comparación con los control (Tabla 7). A nivel basal no hubo diferencias en los strains 3D del miocardio. Sin

embargo, una semana tras I/R, el strain 3D longitudinal, radial y circunferencial fueron significativamente mejores en los cerdos tratados con exenatida (Tabla 7). Un mes después de I/R la mecánica del miocardio del VI en el grupo de exenatida mostró una mayor recuperación debido a una mejora de los strain 3D longitudinal y circunferencial. Sin embargo, en este estadio, el strain 3D radial sólo presentaba una tendencia hacia la mejora con el tratamiento (Tabla 7).

	Basal		1 semana		1 mes	
	Control	Exenatida	Control	Exenatida	Control	Exenatida
FEVI 3D (%)	69,6 ± 1,6	70,7 ± 0,9	31,9 ± 1,9	39,1 ± 0,9**	32,5 ± 1,6	40,4 ± 0,7**
Strain longitudinal 3D (%)	-23,5 ± 1,0	-22,2 ± 1,0	-10,5 ± 0,9	-13,7 ± 1,2*	-11,7 ± 0,6	-15,5 ± 0,8**
Strain circunferencial 3D (%)	-27,8 ± 2,8	-26,4 ± 2,5	-12,9 ± 1,1	-16,6 ± 1,4*	-12,5 ± 1,4	-17,1 ± 1,4*
Strain radial 3D (%)	128,6 ± 15,3	128,7 ± 13,5	36,6 ± 3,8	64,9 ± 12,6*	35,7 ± 3,6	55,8 ± 6,5*

Tabla 7. Resultados de la Ecocardiografía 3D una semana y un mes después de un proceso de I/R en cerdos tratados o no con exenatida. * p < 0,05 y ** p < 0,01 vs. control.

4.3.3. La exenatida redujo el remodelado del ventrículo izquierdo

La administración de GLP-1 en el periodo periinfarto se asoció con una tendencia hacia una disminución del IMVI a una semana tras el IAM (Tabla 6). Curiosamente, en el periodo de tiempo comprendido entre una semana y un mes después del IAM, los animales tratados con exenatida aumentaron el peso del VI solo un 9,5% en comparación con un 19,9% en el grupo control (Figura 28a). Además encontramos una fuerte correlación entre el IMVI y la FEVI (Figura 28b), lo que indica que los animales con menor FEVI generaron la mayor respuesta hipertrófica compensadora. Sin embargo, no encontramos diferencias en el volumen telediastólico ni en el volumen telesistólico del VI entre los grupos exenatida y control una semana y un mes después del IAM (Tabla 6). Por otra parte determinamos el índice de esfericidad del VI medido por ecocardiografía 2D. Un mes después del IAM, este índice fue 1,52±0,05 en el grupo tratado en comparación con 1,39±0,03 en el control (Figura 28c y 28d), indicando un menor remodelado cardiaco en los animales tratados.

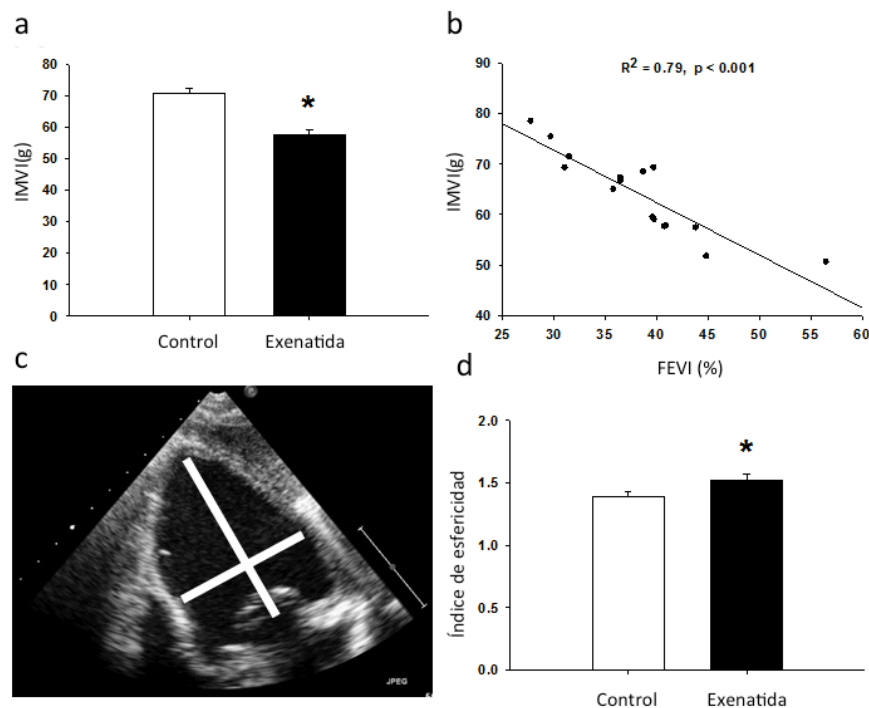


Figura 28. Determinación anatómica del remodelado miocárdico del VI. (a) El tratamiento con exenatida dio lugar a una disminución significativa del IMVI medido por RM. (b) Correlación inversa entre IMVI y la FEVI. (c) Imagen representativa del plano de 4-cámaras por ecocardiografía 2D con los trazados para el cálculo del índice de esfericidad. (d) Índice de esfericidad. * $p < 0,05$.

4.3.4. Exenatida redujo la hipertrofia celular y la activación de Akt y ERK1/2

Con el objetivo de confirmar las diferencias en el IMVI observadas por RM, llevamos a cabo la determinación del tamaño celular por análisis histológico de la zona remota del miocardio a través de la inmunodetección de vinculina (Figura 29 a). Un mes después de I/R, el área transversal de los cardiomiocitos de los animales tratados era significativamente menor que la de el control ($149,9 \pm 6,6$ vs. $177,5 \pm 4,0 \mu\text{m}^2$, Figura 29b). De manera similar, el perímetro de los cardiomiocitos de la zona remota del grupo tratado estaba reducido significativamente ($1493,1 \pm 127,3$ vs. $2085,2 \pm 88,3 \mu\text{m}^2$, Figura 29b).

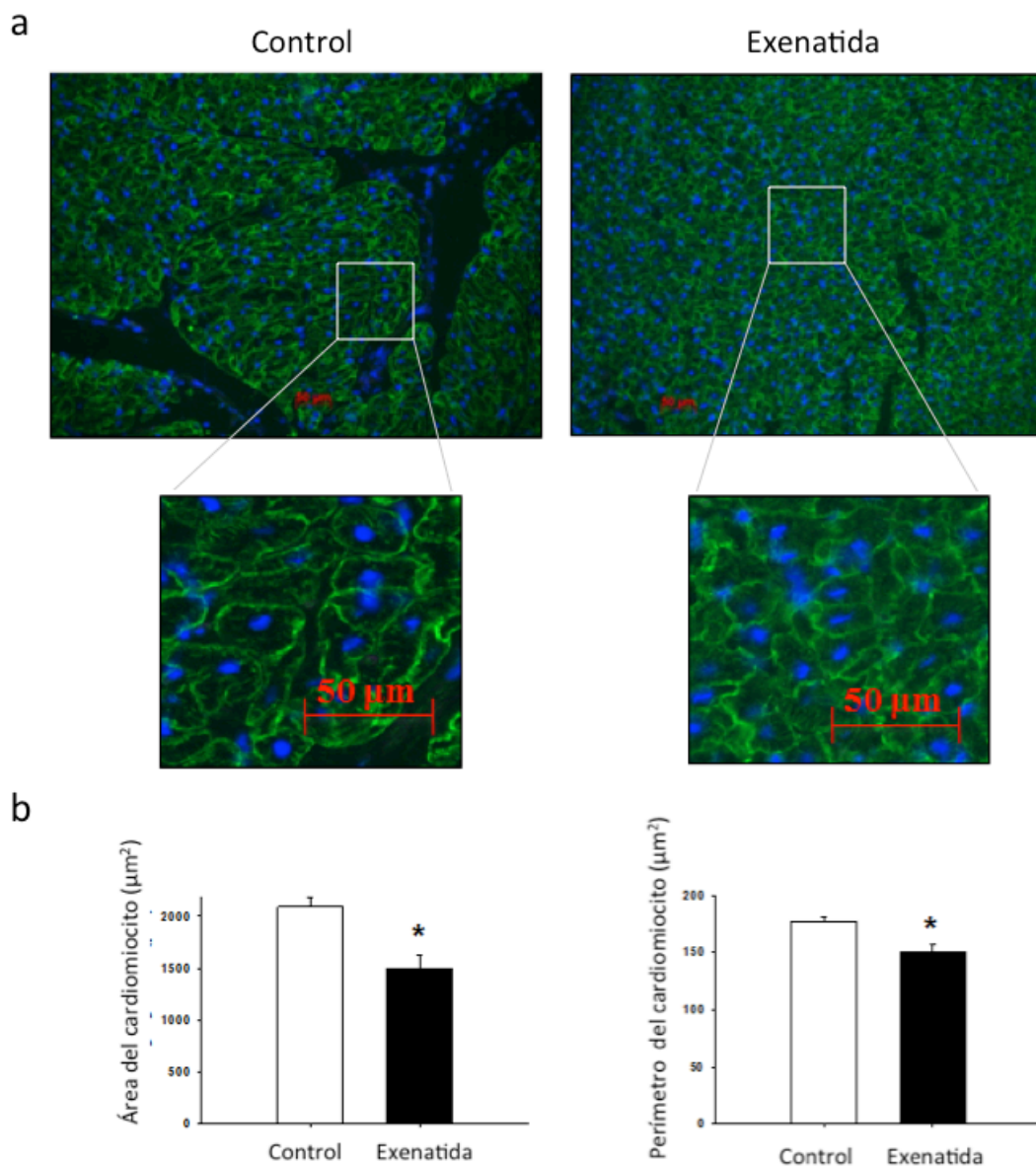


Figura 29. Determinación histomorfométrica de la hipertrofia del VI tras I/R. (a) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica para vinculina en el miocardio de la zona remota en los animales control y tratados. **(b)** El tratamiento con exenatida indujo una menor hipertrofia del cardiomiocito en comparación con control. * $p < 0,05$.

Para entender mejor los mecanismos subyacentes a las diferencias en la hipertrofia compensatoria, analizamos la expresión de Akt y de ERK1/2 en el tejido de la zona remota del miocardio. Un mes después de I/R, tanto la fosforilación de Akt como de ERK1/2, estaba significativamente incrementada en el grupo control en comparación con el grupo tratado (Figura 30a).

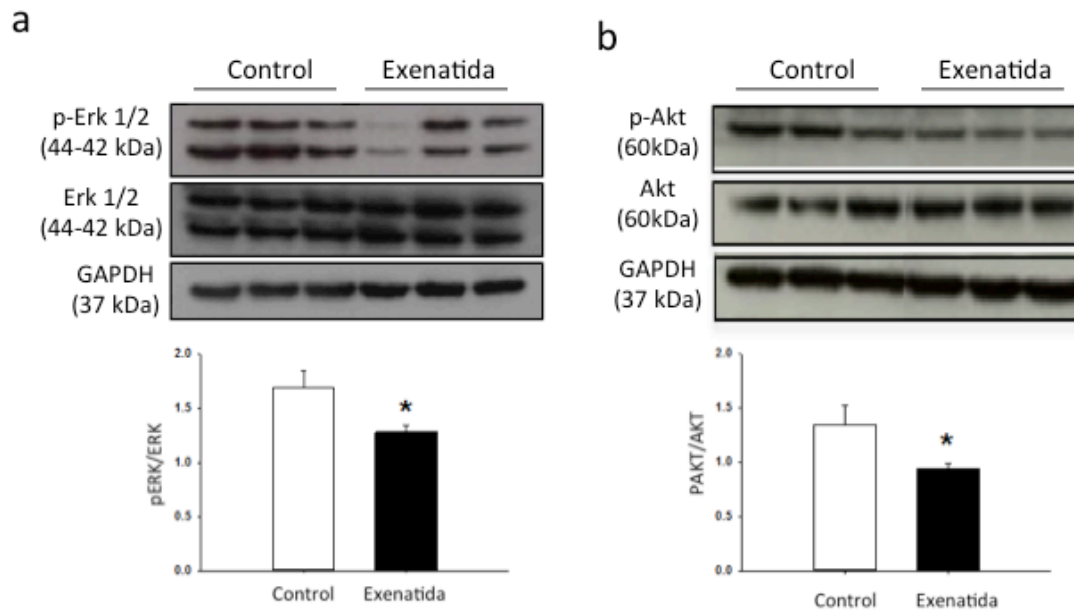


Figura 30. Expresión proteica en el miocardio remoto del VI. (a) Western blot de p-ERK1/2, ERK1/2, y GAPDH. **(b)** Western blot de p-AKT, AKT y GAPDH. * $p < 0,05$.

4.3.5. Exenatida disminuyó la fibrosis intersticial principalmente en la zona borde del área infartada

Mediante tinción tricrómica de Masson cuantificamos el porcentaje de área fibrótica en la zona de la cicatriz, en el borde y en el área remota del miocardio. No encontramos diferencias en el acúmulo de fibrosis en la zona de la cicatriz ($29,8 \pm 3,0$ vs. $35,8 \pm 7,6\%$; ni en la zona remota del miocardio ($1,2 \pm 0,3$ vs. $1,0 \pm 0,1\%$) (Figura 31). Sin embargo, el miocardio de los cerdos tratados con exenatida exhibieron significativamente menos acúmulo de MEC que los controles en la zona borde ($1,7 \pm 0,3$ vs. $4,7 \pm 1,1\%$) (Figura 31a). Además, llevamos a cabo un análisis por la técnica no invasiva T1-Mapping para la determinación de la fibrosis intersticial. Los tiempos T1 de relajación post-contraste fueron mayores en el grupo con exenatida con respecto al control ($481,5 \pm 46$ vs. $424,5 \pm 50,3$), lo que sugiere un mayor grado de fibrosis miocárdica en los cerdos no tratados (Figura 31b).

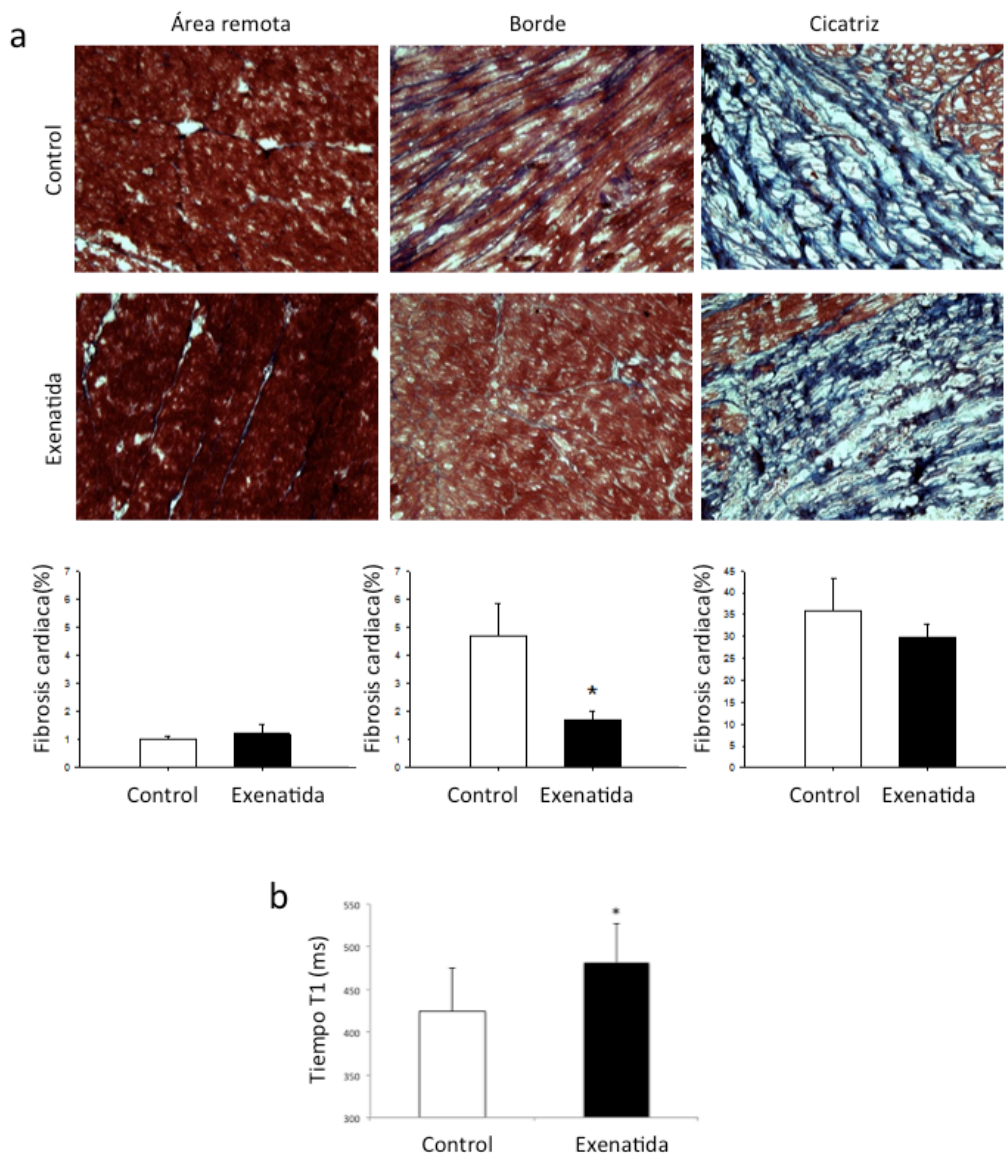


Figura 31. Cuantificación de la fibrosis miocárdica un mes después de I/R. (a) Imágenes histológicas representativas de la tinción de Masson en las zonas remota, borde y cicatriz del VI (la zona fibrótica aparece en azul verdoso) y su cuantificación. **(b)** Tiempos T1 de relajación post-contraste. * $p < 0,05$.

En conclusión, en esta tercera parte de la tesis podríamos sugerir que el tratamiento con exenatida podría ser también beneficioso en miocardiopatías de daño agudo como el IAM, al menos en lo que se refiere a los procesos de fibrosis e hipertrofia celular.

5. Discusión

5. 1. La STZ-DM1 crónica estimula procesos de apoptosis, fibrosis e hipertrofia y, principalmente, alteraciones metabólicas en el miocardio

En modelos experimentales y pacientes diabéticos se ha descrito la relación directa entre DM y miocardiopatía. La MCD se presenta en un número elevado de pacientes diabéticos mediante anormalidades ecocardiográficas que incluyen, desde disfunción diastólica hasta disfunción sistólica, lo que representa más del 50% de los pacientes en estadios clínicos y preclínicos. En la DM, la mayor parte de los pacientes fallece por causas CV. Además, la DM es un factor de riesgo importante para padecer un IAM; los pacientes DM2 tienen el mismo riesgo de padecer un IAM que una persona no diabética que ya padeció uno anteriormente. La resistencia a la insulina, hiperglucemia e hiperlipemia desencadenan fenómenos de inflamación, esteatosis, apoptosis, estrés oxidativo, hipertrofia y fibrosis cardíaca.

Los procesos de hipertrofia, muerte celular y fibrosis son característicos del corazón DM y se han descrito en el corazón DM tanto en humanos^{44,66} como en modelos experimentales de corta duración^{12,41,149}. La hipertrofia miocítica es una característica común (aunque no siempre presente) en biopsias de miocardios DM⁴². En este sentido, observamos en nuestro modelo de MCD crónico en ratas DM1 inducida por STZ un aumento del tamaño celular, factores prohipertróficos y muerte celular por apoptosis. Además, proteínas que participan en este proceso presentaron niveles de expresión elevados (Fas, FasL, ratio Bax/Bcl-2, caspasa-3). La fibrosis intersticial es fundamental en el desarrollo de la MCD apareciendo en etapas tempranas y contribuyendo a la disfunción cardíaca⁵⁷. Este proceso tiene lugar para el remplazo de los miocitos necróticos y como respuesta del tejido conectivo ante una situación patológica³⁶. Así, observamos en STZ-DM1 una estimulación del sistema TGF β y de uno de sus cofactores, CTGF. Coherentemente, factores de transcripción ligados a este sistema como Smads y AP-1 presentaron una actividad de unión significativamente superior con respecto a los miocardios control.

Una vez caracterizado el corazón de las ratas STZ-DM1, nuestro estudio proteómico reveló alteraciones en la expresión de proteínas cardíacas relacionadas con el metabolismo, función mitocondrial, regulación del citoesqueleto y muerte celular. En este sentido, observamos que existía una elevación de ANXA5, una novedosa molécula prohipertrófica recientemente detectada por proteómica. Esta molécula está asociada con el intercalado de los discos entre sarcómeros actuando como regulador de proteínas asociadas a Ca²⁺ como chaperonas de estrés térmico (HSPs)¹⁷. ANXA5 ha sido relacionada con hipertrofia ventricular y disfunción sistólica en pacientes hipertensos⁹⁶. La carencia de energía, la acumulación de intermediarios de la oxidación de glucosa y lípidos, y la producción de ROS pueden inducir hipertrofia a

través de la expresión de ANXA5^{68,44}. Otros factores pro-hipertróficos como desmina (DES) y proteínas LIM también estaban sobre-expresados en el corazón STZ-DM1. LDB3, proteína de dominio 3 de unión a LIM puede ser estimulada por la acumulación de lípidos, como ocurre en DM1 y cuya función es actuar como andamiaje para ensamblar proteínas con quién interactúan (ejemplo ACTC1, MYOZ) durante la hipertrofia celular⁵⁸. La hipertrofia, por tanto, podría considerarse una respuesta mal adaptativa al daño por STZ-DM1 que cursa con un aumento de proteínas del citoesqueleto que causaría una mayor rigidez y muerte celular. Además, encontramos una regulación de ENO y PDKM2 del metabolismo de la glucosa y una reducción de proteínas del TCA como la MDH2, CS, IDH3A, ACO2 y SUCLG1. El cambio de sustrato metabólico disminuyendo la utilización de glucosa por el miocardio, ha demostrado estar directamente relacionado con la disfunción miocárdica tanto en modelos animales como en sujetos con resistencia a insulina. La modificación de los niveles de estas proteínas sugiere un desacoplamiento de la glicólisis y oxidación del piruvato que podría resultar en una acumulación de intermediarios glicolíticos. Estos metabolitos podrían desviarse a las rutas de síntesis de AGEs y ribosa/hexosamina, que a su vez podrían regular la expresión de genes de la glicólisis. En efecto, la expresión de PKM2 es regulada por glucosa 6-P y otros intermediarios de la oxidación de la glucosa^{157,139}. Además, también observamos una disminución de proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial como la ATP5A1, UQCRC1 y CKM. En este sentido, estudios previos han demostrado una disminución en la respiración mitocondrial y en proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa en ratones DM2 lo que sugiere una alteración en la capacidad oxidativa de la mitocondria y una reducción de la producción de ATP que contribuiría a la disfunción contráctil del corazón¹³. Mediante análisis de predicción observamos que el miocardio DM1 podría poseer alterada la utilización de glucosa y la obtención de energía y, consecuentemente, inducir una respuesta hipertrófica y apoptótica. De hecho, en estudios previos se ha sugerido que la hipertrofia, la atrofia y la pérdida celular están inducidos por alteraciones metabólicas mantenidas en el transcurso de la DM⁹².

A pesar de los avances de los últimos años, los tratamientos terapéuticos actuales están centrados fundamentalmente en el control de la glucemia, pero no son suficientes para prevenir las complicaciones CV en pacientes crónicos. Esta situación exige el desarrollo de nuevas estrategias capaces de preservar la función cardíaca contribuyendo al cuidado de estos pacientes. En este sentido, y tras el análisis de nuestro primer modelo de STZ-DM1, nos propusimos estudiar el efecto de fármacos moduladores del metabolismo y supervivencia celular como posible estrategia para paliar las respuestas deletéreas de la DM en el corazón. Así, analizamos el efecto de la estimulación del sistema incretina en el desarrollo de la MCD y

tras I/R experimental..

5. 2. La estimulación del sistema incretina podría atenuar efectos adversos de la Miocardiopatía Diabética y del daño por Isquemia/Reperusión

Se han demostrado efectos cardioprotectores de las incretinas en el tratamiento de la resistencia a insulina en DM2. Sin embargo, algunas evidencias indican que las incretinas podrían poseer efectos insulino-independientes, potencialmente beneficiosos en otras cardiopatías mediante acciones directas sobre el cardiomiocito.

5.2.1. La sitagliptina reduce el remodelado cardiaco en DM2 experimental. Potencial papel mediador de PPAR β/δ

En nuestro estudio con ratas DM2, no hipertensas ni obesas, el miocardio de las ratas no tratadas mostró un aumento de apoptosis y de necrosis celular, hipertrofia y deposición de MEC característica de fibrosis, así como una disminución de la expresión de PPAR β/δ . En ensayos clínicos como el UKPDS, ACCORD o el ADVANCE se ha estudiado el impacto de un tratamiento intensivo del control de la glucemia sobre los eventos CV⁸⁸. Un control estricto de la glucemia ha demostrado ser beneficioso a nivel microvascular. Sin embargo, todavía no se ha podido probar que sea beneficioso a nivel macrovascular en eventos como el IAM⁶. Entre los tratamientos actuales para el tratamiento de la DM2, la metformina es el fármaco de primera elección, el cual actúa principalmente reduciendo la gluconeogénesis hepática e incrementando la sensibilidad a insulina. Estudios en modelos experimentales de MCD han demostrado un efecto cardioprotector de la metformina, fundamentalmente por su efecto antiapoptótico en cardiomiocitos. Nosotros observamos en DM2 que el tratamiento con metformina mejoraba el control de la glucemia y la lipidemia e inducía fenómenos antiapoptóticos y antinecróticos, reducía la fibrosis e hipertrofia miocárdica y mejoraba la función cardiaca de los animales. Sin embargo, se ha visto que en DM1 estos efectos podrían estar más relacionados con la disminución de los niveles de glucosa y triglicéridos en plasma que con una respuesta específica sobre el miocardio^{140,116}. En nuestros experimentos *in vitro* la metformina inducía una influencia antifibrótica directa en células cardiacas, tanto en cardiomiocitos como en fibroblastos estimulados con HG a través de AMPK, un conocido mediador de la metformina en la DCM¹⁵⁵, y produjo cierto efecto antiapoptótico. Aunque en estudios recientes en pacientes no diabéticos no se ha demostrado que la metformina posea una acción directa sobre el remodelado cardiaco, no se puede descartar su efecto cardioprotector agudo.

Por otro lado existen evidencias de la expresión de GLP-1R en el corazón, lo que hace posible un efecto directo de fármacos que estimulan el sistema incretina⁸. Hasta el momento existe poca información acerca de los efectos de estas terapias sobre el miocardio, pero

algunos estudios han llevado a resultados prometedores^{77,91}. La acción principal de las incretinas es la regulación postprandial de la glucemia estimulando la secreción de insulina de una forma dependiente de glucosa. En concordancia con estos datos, la sitagliptina redujo los niveles de glucosa circulante en nuestras ratas GK y mejoró la resistencia a insulina. Además, se observó una mejoría del perfil lipídico en sangre que podría estar relacionada con el efecto de GLP-1 en la absorción⁹⁰ y metabolismo²² de lípidos, y con la activación de PPARs (ver más adelante). La sitagliptina mejoró la función e hipertrofia cardíaca (disminuyó el tiempo de deceleración, el grosor PPVI y el IMVI) y atenuó la apoptosis, necrosis, hipertrofia y fibrosis cardíaca. En este sentido, el aumento en los niveles de DPP-4 circulante está asociado con un mayor riesgo de disfunción cardíaca en pacientes DM2¹¹⁰. En relación a la fibrosis, la sitagliptina redujo la expresión de TGF β , CTGF y fibronectina, y estas acciones fueron reproducidas en cardiomiocitos en cultivo tras la incubación con GLP-1. Se ha observado que ratones deficientes en GLP-1R presentan una alteración de la contractilidad y de la función diastólica. En un estudio con un agonista de GLP-1R, liraglutida, se ha demostrado que este fármaco mejora la función cardíaca en ratas DM2, independientemente de su efecto sobre la glucemia⁷⁷. Sin embargo, el hecho de que la metformina indujera acciones cardioprotectoras similares a la sitagliptina, nos hace pensar también en el efecto dependiente de insulina.

Sin embargo, los efectos cardioprotectores de la sitagliptina observados *in vivo* e *in vitro* podrían deberse a la acción de GLP-1(9-36). Este metabolito indujo una acción cardioprotectora similar a GLP-1 en nuestros cardiomiocitos en cultivo. Previos datos sugieren que GLP-1(9-36) posee acciones cardioprotectoras a través de GLP-1R u otros receptores^{8,8}. Aunque no se conoce el papel biológico de GLP-1(9-36) en humanos, recientes estudios en animales han sugerido dos efectos potenciales de este metabolito; uno como antagonista competitivo de GLP-1 y otro como promotor de la utilización de glucosa por los tejidos periféricos. Un estudio realizado en humanos concluyó que GLP-1(9-36) no regula la liberación de insulina ni el metabolismo de la glucosa en pacientes sanos¹³⁷. Sin embargo, GLP-1(9-36) sí promovió la utilización de glucosa en un modelo de cerdos, sin tener ningún efecto sobre la liberación de insulina ni antagonizar los efectos insulíntrópicos del GLP-1 intacto²⁷. En nuestros experimentos encontramos un efecto antifibrótico similar en células tratadas con GLP-1 o GLP-1(9-36) en cardiomiocitos estimulados con HG y HF. El cardiomiocito en cultivo es capaz de sintetizar DPP-4 por lo que este efecto de GLP-1 puede ser consecuencia, al menos en parte, de la actividad de su metabolito GLP-1(9-36). Además, cuando añadimos sitagliptina, ésta revirtió el efecto antifibrótico de GLP-1. En este sentido se ha observado que GLP-1(9-36) ejerce efectos antioxidantes en células cardíacas y vasculares^{2,134}. Sin embargo, GLP-1(9-36) puede ser degradado por la peptidasa neutral, que actúa sobre diferentes sitios amino proximales internos y da lugar a péptidos más pequeños

como GLP-1(28-36) y GLP-1(32-36) los cuales actúan sobre la mitocondria donde ejercen acciones antioxidantes a través de la supresión de la oxidación de FAs y gluconeogénesis^{59,134}. Estos resultados son consistentes con la existencia de acciones dependientes e independientes de GLP-1R, que participan en el mecanismo cardioprotector de estas incretinas. En este sentido observamos que, aunque no detectamos GLP-1R en fibroblastos cardiacos, tanto GLP-1 como GLP-1(9-36) reducían la expresión de factores profibróticos tras la incubación con HG y HF.

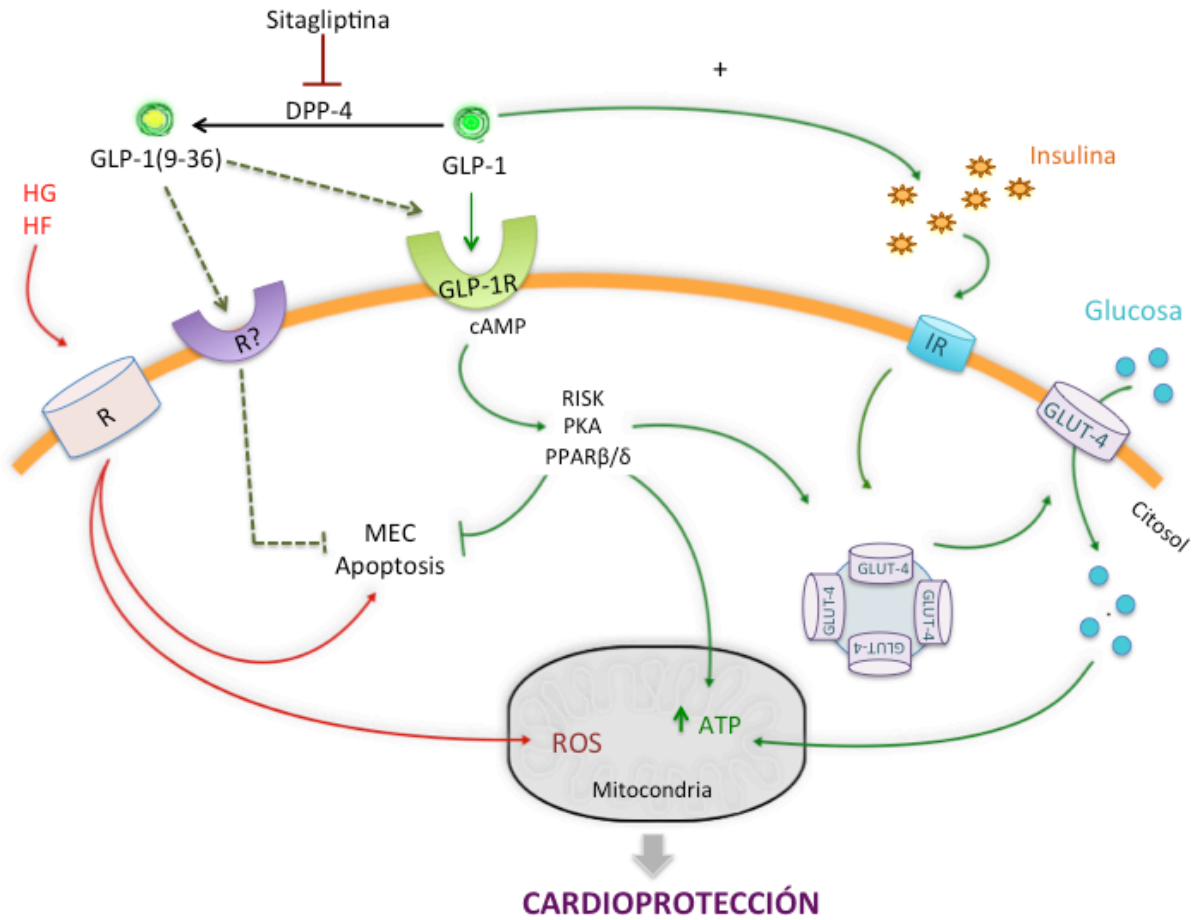


Figura 32. Potencial mecanismo antiapoptótico, antihipertrófico y antifibrótico activado en el miocardio de ratas GK con el tratamiento con sitagliptina. Las células cardíacas en un ambiente diabético están sometidas a HG o HF que pueden estimular la síntesis de moléculas profibróticas a través de la activación de mediadores específicos. Esta respuesta podría atenuarse por el efecto insulínico de GLP-1. Sin embargo, podría existir además un efecto directo de esta molécula sobre la célula, a través de la activación de GLP-1R- PPAR β/δ . Por otra parte, la isoforma GLP-1(9-36) podría también actuar sobre GLP-1R u otro receptor produciendo acciones similares directamente o a través de sus péptidos de degradación, GLP-1 (28-36) y GLP-1(32-36), que actúan en la mitocondria y tienen un efecto antioxidante, supresor de la oxidación de FA y aumentan la eficiencia energética celular¹³⁴.

Los mecanismos moleculares activados por las isoformas de GLP-1 y GLP-1(9-36) no se conocen con exactitud. Es posible que GLP-1 pudiera desencadenar un efecto dual cardioprotector sobre el miocardio, concretamente a través de GLP-1R u otros receptores y a

través de la mejora de la resistencia a insulina. Algunos grupos han demostrado previamente el efecto antiapoptótico de GLP-1 en células HL-1, mediado principalmente por la ruta molecular de PI3K y parcialmente por la vía de ERK1/2¹¹¹. Además, GLP-1, a través de la unión a su receptor GLP-1R activa vías de señalización intracelular de supervivencia así como la activación de mediadores PPAR, receptores nucleares de FAs²⁰. Los PPARs son reguladores del transporte, almacenamiento y utilización de lípidos principalmente induciendo la expresión de FAT/CD36, enzimas de la oxidación de FAs, y PDK4. En animales DM2, el uso de fármacos agonistas de PPAR α o PPAR γ reducen el fenotipo MCD, probablemente normalizando la captación dependiente de insulina de glucosa por el miocardio y reduciendo la acumulación lipídica en el miocardio. Sin embargo, su uso en clínica puede producir efectos secundarios adversos²⁸. PPAR β/δ es una isoforma altamente expresada en las células cardiacas que promueve acciones beneficiosas en el corazón diabético mediante la estimulación de enzimas de la oxidación de ácidos grasos como CPT1 o FAS (sintasa de ácido graso)³⁷. Un estudio realizado reveló que la activación de NF κ B en células cardiacas inhibía la actividad de PPAR β/δ , que resultaba en la reducción de la expresión de PDK4 y un aumento en la oxidación de la glucosa¹⁰⁴. Además, PPAR β/δ podría controlar la expresión de ciertos factores profibróticos. Nuestros resultados demuestran un aumento de la expresión de PPAR β/δ en el miocardio de las ratas GK tratadas con sitagliptina lo que sugiere la intervención de este receptor en la señalización de GLP-1 y, por tanto, en su efecto beneficioso. En este sentido observamos que un agonista de PPAR β/δ reducía la expresión de FN en células estimuladas con HG. En condiciones de HF, el agonista de PPAR β/δ no modificó los niveles de FN, probablemente porque PPAR β/δ es también mediador de la señalización de FAs en la célula. Wagner y colaboradores describieron una reducción del contenido miocárdico de colágeno en ratones tratados con un agonista de PPAR β/δ ¹⁴⁴. Por lo tanto, al menos en lo que se refiere al proceso de fibrosis, GLP-1 podría estar ejerciendo su efecto a través de la activación de PPAR β/δ (Figura 8).

Así, GLP-1 y sus productos de degradación (GLP-1(9-36), GLP-1(28-36) y GLP-1(32-36)) podrían inducir acciones antiapoptóticas y antifibróticas en la MCD a través de efectos insulino-dependientes y directos sobre las células cardiacas, mediante la estimulación de rutas de supervivencia y/o PPARs. El efecto cardioprotector de estos péptidos de degradación podrían explicar la ventaja potencial del uso de agonistas de GLP-1R frente a DDP-4i.

5.2.2. La exenatida podría disminuir el tamaño de infarto y el remodelado cardiaco en un modelo de IAM

La estimulación de GLP-1R podría ser beneficiosa, no sólo en modelos experimentales de daño crónico como la MCD sino también en modelos de daño agudo como el IAM. Durante mi estancia en el laboratorio del Prof. Badimón en el Hospital Monte Sinaí de Nueva York, desarrollamos un modelo experimental porcino de daño cardiaco por I/R con el objetivo de analizar el efecto del tratamiento con exenatida sobre este proceso.

La perfusión precoz del miocardio isquémico es la terapia probada más efectiva para reducir el tamaño del infarto, preservar la función sistólica del VI y reducir la morbilidad y mortalidad cardiovascular en pacientes con IAM con elevación del segmento ST (generalmente relacionada con la oclusión aguda y completa de una arteria coronaria)⁶⁷. Sin embargo, la perfusión *per se* induce un daño miocárdico y estimula la muerte de los cardiomiocitos (la denominada lesión por I/R), lo que, paradójicamente, disminuye los beneficios de esta terapia. El concepto del daño miocárdico por perfusión se observó inicialmente en experimentos con animales en los que se demostraba la reducción en el tamaño final del infarto por intervenciones terapéuticas en el momento de la restauración del flujo sanguíneo en el miocardio isquémico¹⁴. La apoptosis juega un papel importante en estos eventos ya que es un proceso activo que requiere energía. La perfusión proporciona la energía necesaria para ejecutar la señales apoptóticas que estaban activadas durante la isquemia y la hipoxia.

Actualmente hay un interés especial en la identificación de estrategias y tratamientos que minimicen el daño miocárdico tras un proceso de I/R. Algunas evidencias iniciales indican que ciertas intervenciones farmacológicas podrían ser utilizadas para reducir el daño por I/R en humanos^{107,79}. El tratamiento farmacológico enfocado en la activación de rutas de supervivencia e inhibición de rutas de muerte celular se ha utilizado para reducir el tamaño de infarto. Sin embargo, hasta el momento no existe ningún fármaco para el que se haya demostrado de forma concluyente su eficacia sobre este parámetro, cuando se administra en combinación con la terapia de perfusión. Se ha demostrado que el preconditionamiento isquémico mediante oclusión coronaria breve y perfusión previas a un periodo sostenido de oclusión coronaria con perfusión, parece ser efectivo disminuyendo el desarrollo del IAM⁵⁵. Sin embargo, esta técnica no es clínicamente útil puesto que en la mayoría de los casos es complicado saber cuando un paciente va a sufrir un IAM⁵⁵. Por otro lado, el postcondicionamiento isquémico mediante la oclusión coronaria breve y repetida durante la perfusión precoz del miocardio isquémico, reduce el tamaño de infarto. Los protocolos de condicionamiento ponen en marcha cascadas de señalización que conducen a la

cardioprotección y han sido probados en pacientes obteniéndose resultados prometedores. Sin embargo, los resultados no son concluyentes⁵⁵. Los estudios preclínicos que evalúan el daño por I/R están frecuentemente limitados por el corto periodo de seguimiento, y porque el objetivo principal suele ser la reducción del tamaño de infarto. En este estudio investigamos las propiedades cardioprotectoras de la exenatida en un modelo porcino que asemeja el daño por I/R que se produce en humanos. El principal objetivo de este estudio fue determinar si el tratamiento con exenatida en el periodo periinfarto podría promover la cardioprotección y mitigar el remodelado cardiaco. Además, se llevó a cabo la evaluación de los mecanismos de remodelado cardiaco en la fase crónica de la recuperación tras el IAM. A diferencia de otros estudios de experimentación con cerdos para la evaluación del efecto de exenatida en el daño por I/R¹³³, nuestros resultados proporcionan un seguimiento de un mes y utilizan medidas *in vivo* del tamaño de infarto y recuperación del miocardio obtenidas por RM, la metodología más exacta y mejor considerada para estas medidas.

Las terapias basadas en la estimulación del sistema incretina están establecidas para el tratamiento de la DM2. Sin embargo, estudios recientes indican que estos tratamientos podrían ser beneficiosos en el contexto de la I/R puesto que podrían modular el remodelado a través del aumento de la asimilación de glucosa y disminución de factores proapoptóticos y profibróticos como sucedía con el tratamiento con sitagliptina en MCD. Nuestros datos indican que la administración de exenatida antes de la reperusión y durante tres días tras el IAM aumenta significativamente el miocardio recuperado y reduce el tamaño de infarto lo cual es consistente con estudios previos en este proceso¹³³. La exenatida podría ejercer este efecto cardioprotector a través de varios mecanismos. Durante la isquemia existe un déficit de oxígeno y de nutrientes, lo que hace que el metabolismo cardiaco se desplace hacia la glucosa como sustrato principal de obtención de energía²⁹. Exenatida favorece el metabolismo de la glucosa. Similares efectos se han observado en un modelo de miocardiopatía dilatada en perros, lo que indica que esta molécula podría estimular la obtención eficiente de ATP ejerciendo un papel protector⁹⁹. En este trabajo se demuestra además que el tratamiento con exenatida en el periodo periinfarto reduce el remodelado cardiaco en un modelo de animal grande. En primer lugar, los animales del grupo tratado con exenatida presentaron una menor masa del VI, es decir una menor hipertrofia compensadora, uno de los componentes principales del remodelado adverso del VI. Además, se observó una disminución de la hipertrofia de los miocitos en comparación con los grupos control. El IMVI y la FEVI medidos un mes después del IAM estaban inversamente correlacionados. Ésto indica que los animales con mayor disfunción ventricular y tamaño de IAM, experimentan una mayor hipertrofia cardiaca compensadora y remodelado. Se observó que el tratamiento con exenatida reducía el remodelado compensatorio del VI. Además, estos hallazgos fueron

completados a nivel molecular mediante el estudio de proteínas relacionadas con el crecimiento celular y desarrollo de hipertrofia como Akt y ERK1/2. La potencial activación de GLP-1R con exenatida durante el IAM produjo una disminución de la activación de la ruta RISK (ERK1/2 y de Akt) en la fase de recuperación después de un mes del evento.

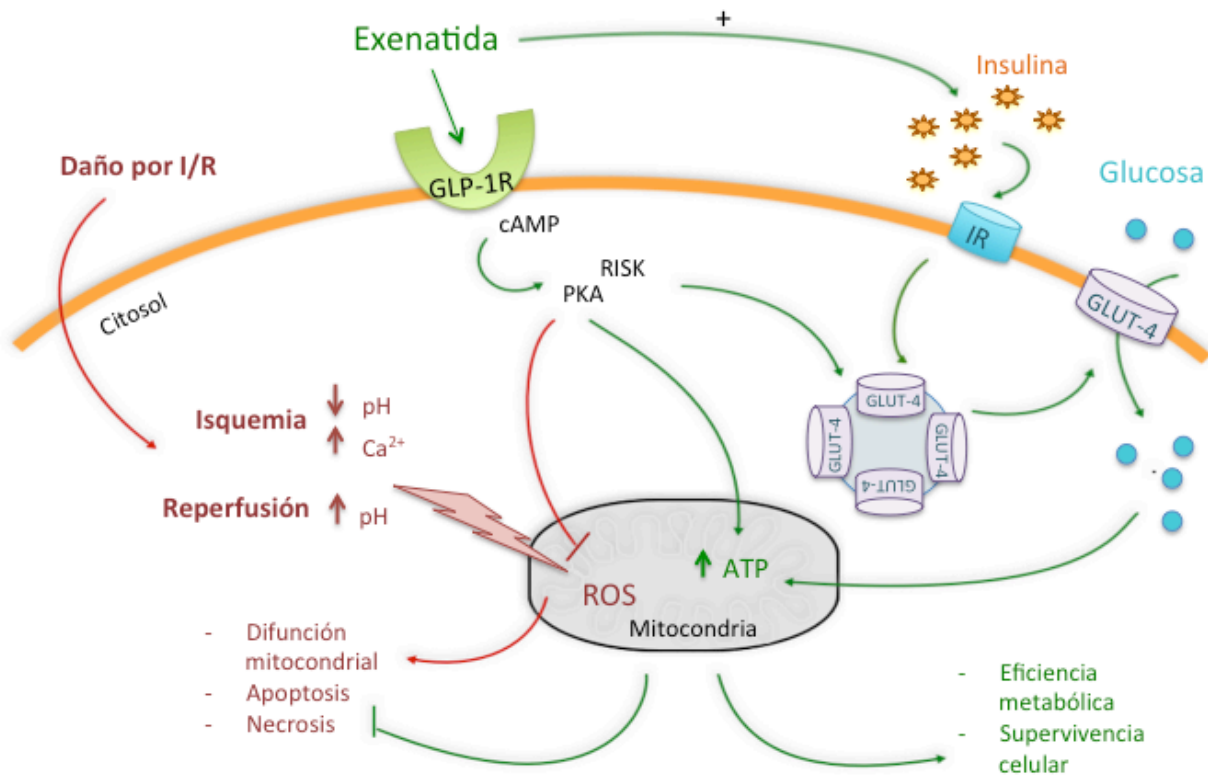


Figura 33. Potenciales mecanismos cardioprotectores de GLP-1 en el daño por I/R. GLP-1 podría estar activando rutas de supervivencia celular y por otro lado mejorando la eficiencia del metabolismo energético.

Otro marcador de remodelado cardíaco es la fibrosis intersticial que ocurre en la zona no infartada, tanto en el miocardio limítrofe (zona borde) como en el miocardio remoto. Nuestros resultados muestran una menor fibrosis miocárdica intersticial en el miocardio borde de los cerdos tratados con exenatida y, además, sugieren que hay una menor fibrosis intersticial en el tejido remoto no infartado. Esta disminución de fibrosis intersticial se confirmó mediante la técnica de T1 mapping. El tejido remoto de los cerdos del grupo de exenatida presentaba un tiempo T1 post-contraste más largo (es decir, menos fibrosis) que el del grupo control. La fibrosis intersticial está asociada con un peor pronóstico clínico por lo que en este aspecto demuestra un efecto beneficioso del tratamiento en lo que se refiere al remodelado tras I/R.

En coherencia con nuestros resultados anteriores, la exenatida redujo el tamaño de infarto a través de la disminución del estrés oxidativo y de la expresión de factores

proapoptóticos como la caspasa-3, en un modelo porcino de daño miocárdico por I/R¹³³. Además, al mejorar la resistencia a insulina en el miocardio, se favorece el efecto antiapoptótico en las células cardíacas^{1,45}. En este sentido el tratamiento con metformina está asociado con un efecto beneficioso frente al daño por I/R en pacientes diabéticos. Sin embargo, en pacientes no diabéticos, el uso de metformina comparado con placebo no mejora la FEVI tras 4 meses⁷⁴. Estos ensayos clínicos apoyarían el hecho de que la exenatida estaría ejerciendo su acción por medio de su acción directa sobre el corazón y no por su efecto sobre el control de la glucosa en sangre. En este sentido Lonborg y colaboradores estudiaron pacientes con IAM con ascenso de ST que fueron tratados con infusión continua de exenatide (iniciada 15 minutos antes de la angioplastia primaria y continuada durante 6 horas). El tratamiento con exenatide aumentó el área de miocardio salvado, siendo más importante este efecto en pacientes con infarto anterior (es decir, con un gran área en riesgo)⁷⁹. Asimismo, el tratamiento con exenatida redujo el tamaño de IAM en un 30% en aquellos pacientes que se presentaron con poco tiempo de dolor torácico (con poca duración del IAM)⁷⁸. Estos resultados son esperables pues cuanto más tiempo transcurra desde el comienzo del IAM, mayor es la proporción de células necróticas y menor es la proporción de células apoptóticas que pueden recuperarse. No obstante, estos ensayos clínicos han estudiado tamaños muestrales pequeños y los resultados no son aún concluyentes. Nuestros datos muestran asimismo que la reducción del tamaño de infarto se ve confirmada por una mejora en la FEVI en los cerdos tratados con exenatide. Es sabido que este fármaco posee un efecto inotrópico positivo incrementando la FEVI. No obstante, dado que la vida media de exenatida es de menos de 12 horas y que el tratamiento tan sólo duró 3 días, la mejoría de la FEVI al mes no puede ser debida a la acción directa de exenatida sobre el miocardio al cabo de un mes, sino a la reducción inicial del tamaño de IAM.

La funcionalidad de VI es uno de los parámetros que permiten determinar si existe un daño miocárdico tras un IAM. La ecocardiografía 2D es el método más utilizado para medir la FEVI por su accesibilidad, rapidez y ausencia de efectos secundarios; no obstante, la FEVI medida por ecocardiografía 2D realiza asunciones geométricas para estimar los volúmenes ventriculares que no siempre son ciertas en presencia de alteraciones de la contractilidad segmentaria, como ocurre en la situación post-IAM. De hecho, la FEVI puede permanecer preservada a pesar de que exista una alteración en el movimiento de uno o incluso más segmentos miocárdicos. En este estudio usamos la FEVI medida por RM y por ecocardiografía 3D. La RM es la técnica más valorada y precisa para la evaluación de volúmenes ventriculares y FEVI, aunque en muchos estudios no se puede usar por su escasa disponibilidad. Asimismo la ecocardiografía 3D da lugar a una evaluación más específica permitiendo cuantificar la deformación regional del miocardio⁴⁷. En nuestro estudio, esta técnica nos permitió detectar

anomalías en las paredes del VI, mostrando unos valores mejorados en los animales tratados con exenatida. Finalmente, este estudio demuestra los efectos de este tratamiento en el remodelado cardiaco en un modelo de I/R con animal grande. En este sentido se ha probado el efecto de varios fármacos antidiabéticos en el daño por I/R.

En conclusión, los resultados de este trabajo muestran evidencias del papel beneficioso de la intervención farmacológica con un agonista de GLP-1R durante el proceso de I/R disminuyendo el remodelado y mejorando la contractilidad cardiaca tras el IAM. Demostramos que la administración de exenatida en el periodo periinfarto mejora la recuperación de la zona miocárdica en riesgo dando lugar a una disminución del remodelado ventricular y a una mejora en la función sisólica del VI en condiciones no diabéticas. Dicho efecto podría ser, además, directo e independiente de la mejora de la resistencia a la insulina.

6. Conclusiones

Conclusiones

- 1- Apoptosis, hipertrofia y fibrosis son procesos mantenidos en el tiempo en el desarrollo de la miocardiopatía diabética, pudiendo ser consecuencia de alteraciones de proteínas metabólicas.
- 2- En un modelo de miocardiopatía diabética experimental en ratas DM2, un inhibidor de la DPP-4, sitagliptina, reduce la expresión de factores apoptóticos, hipertróficos y fibróticos a través de la mejora de la resistencia a la insulina y mediante un efecto directo de GLP-1 sobre las células. Además, PPAR β/δ podría actuar como mediador de esta acción cardioprotectora. El metabolito GLP-1 (9-36) ejerce efectos antifibróticos directos sobre los cardiomiocitos de forma similar a GLP-1.
- 3- En un modelo experimental porcino de daño miocárdico por I/R, un agonista del GLP-1R, exenatida, ejerce un efecto cardioprotector disminuyendo el tamaño de infarto y el remodelado cardíaco (fibrosis e hipertrofia).

En conclusión, tratamientos que estimulan el sistema incretina podrían ser útiles reduciendo el remodelado cardíaco crónico y disminuyendo la lesión aguda y posterior remodelado, en el tratamiento de la miocardiopatía diabética y en el daño por I/R respectivamente. Este hecho sugiere su utilidad para futuras aplicaciones terapéuticas en el contexto de la enfermedad CV.

Conclusions

- 1- Hypertrophy, apoptosis and fibrosis are processes that are maintained over time during diabetic cardiomyopathy development, and might result from impaired metabolic proteins.
- 2- A DPP-4 inhibitor, sitagliptin, reduces the expression of apoptotic, hypertrophic and fibrotic factors in a T2DM experimental model mediated both by improving insulin resistance and by a direct effect of binding cardiac cells. Furthermore, PPAR β/δ might mediate GLP-1 protective actions. The GLP-1 (9-36) metabolite exerts antifibrotic effects similar to GLP-1 via a direct effect on the cardiomyocytes.
- 3- A GLP-1R agonist, exenatide, exerts cardioprotective effects in an experimental model of ischemia/reperfusion myocardial injury by decreasing infarction size and cardiac remodeling (fibrosis and hypertrophy).

In conclusion, treatments stimulating the incretin system could be effective in reducing both the chronic cardiac remodeling leading to diabetic cardiomyopathy and the acute ischemia/reperfusion injury during AMI which would also reduce adverse post acute myocardial infarction remodeling, and could have further applications in CV disease therapy.

7. Bibliografía

1. Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, and B. A. Hemmings. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15:6541–6551, 1996.
2. Anagnostis, P., V. G. Athyros, F. Adamidou, A. Panagiotou, M. Kita, A. Karagiannis, and D. P. Mikhailidis. Glucagon-like peptide-1-based therapies and cardiovascular disease: looking beyond glycaemic control. *Diabetes Obes. Metab.* 13:302–312, 2011.
3. Aneja, A., W. H. W. Tang, S. Bansilal, M. J. Garcia, and M. E. Farkouh. Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options. *Am. J. Med.* 121:748–757, 2008.
4. Ares-Carrasco, S., B. Picatoste, A. Benito-Martín, I. Zubiri, A. B. Sanz, M. D. Sánchez-Niño, A. Ortiz, J. Egido, J. Tuñón, and O. Lorenzo. Myocardial fibrosis and apoptosis, but not inflammation, are present in long-term experimental diabetes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297:H2109–2119, 2009.
5. Authors/Task Force Members *et al.* ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur. Heart J.* 34:3035–3087, 2013.
6. Azim, S., W. L. Baker, and W. B. White. Evaluating cardiovascular safety of novel therapeutic agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Curr. Cardiol. Rep.* 16:541, 2014.
7. Babu, P. P., G. Suzuki, Y. Ono, and Y. Yoshida. Attenuation of ischemia and/or reperfusion injury during myocardial infarction using mild hypothermia in rats: an immunohistochemical study of Bcl-2, Bax, Bak and TUNEL. *Pathol. Int.* 54:896–903, 2004.
8. Ban, K., M. H. Noyan-Ashraf, J. Hoefer, S.-S. Bolz, D. J. Drucker, and M. Husain. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation* 117:2340–2350, 2008.
9. Belke, D. D., T. S. Larsen, E. M. Gibbs, and D. L. Severson. Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279:E1104–1113, 2000.
10. Beller, G. A. Coronary heart disease in the first 30 years of the 21st century: challenges and opportunities: The 33rd Annual James B. Herrick Lecture of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation* 103:2428–2435, 2001.
11. Bierhaus, A., M. A. Hofmann, R. Ziegler, and P. P. Nawroth. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc. Res.* 37:586–600, 1998.

12. Boudina, S., and E. D. Abel. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* 115:3213–3223, 2007.
13. Boudina, S., S. Sena, B. T. O'Neill, P. Tathireddy, M. E. Young, and E. D. Abel. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* 112:2686–2695, 2005.
14. Braunwald, E., and R. A. Kloner. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J. Clin. Invest.* 76:1713–1719, 1985.
15. Buchanan, J., P. K. Mazumder, P. Hu, G. Chakrabarti, M. W. Roberts, U. J. Yun, R. C. Cooksey, S. E. Litwin, and E. D. Abel. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology* 146:5341–5349, 2005.
16. Bunn, H. F. Nonenzymatic glycosylation of protein: relevance to diabetes. *Am. J. Med.* 70:325–330, 1981.
17. Camors, E., V. Monceau, and D. Charlemagne. Annexins and Ca²⁺ handling in the heart. *Cardiovasc. Res.* 65:793–802, 2005.
18. Campbell, F. M., R. Kozak, A. Wagner, J. Y. Altarejos, J. R. B. Dyck, D. D. Belke, D. L. Severson, D. P. Kelly, and G. D. Lopaschuk. A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 277:4098–4103, 2002.
19. Carvajal, K., M. de la L. Hernández-Esquivel, and R. Moreno-Sánchez. [PPARs, metabolic syndrome and cardiac diseases]. *Arch. Cardiol. México* 77 Suppl 4:S4–66–76, 2007.
20. Clarke, S. J., L. M. McCormick, and D. P. Dutka. Optimising cardioprotection during myocardial ischaemia: targeting potential intracellular pathways with glucagon-like peptide-1. *Cardiovasc. Diabetol.* 13:12, 2014.
21. Claycomb, W. C., N. A. Lanson, B. S. Stallworth, D. B. Egeland, J. B. Delcarpio, A. Bahinski, and N. J. Izzo. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:2979–2984, 1998.
22. Cobble, M. Differentiating among incretin-based therapies in the management of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetol. Metab. Syndr.* 4:8, 2012.
23. Condorelli, G., C. Morisco, G. Stassi, A. Notte, F. Farina, G. Sgaramella, A. de Rienzo, R. Roncarati, B. Trimarco, and G. Lembo. Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation* 99:3071–3078, 1999.
24. Cummins, E. P., E. Berra, K. M. Comerford, A. Ginouves, K. T. Fitzgerald, F. Seeballuck,

- C. Godson, J. E. Nielsen, P. Moynagh, J. Pouyssegur, and C. T. Taylor. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:18154–18159, 2006.
25. Deacon, C. F., A. H. Johnsen, and J. J. Holst. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:952–957, 1995.
26. Deacon, C. F., M. A. Nauck, M. Toft-Nielsen, L. Pridal, B. Willms, and J. J. Holst. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 44:1126–1131, 1995.
27. Deacon, C. F., A. Plamboeck, S. Møller, and J. J. Holst. GLP-1-(9-36) amide reduces blood glucose in anesthetized pigs by a mechanism that does not involve insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282:E873–879, 2002.
28. Della-Morte, D., R. Palmirotta, A. K. Rehni, D. Pastore, B. Capuani, F. Pacifici, M. L. De Marchis, K. R. Dave, A. Bellia, G. Fogliame, P. Ferroni, G. Donadel, F. Cacciatore, P. Abete, C. Dong, A. Pileggi, M. Roselli, C. Ricordi, P. Sbraccia, F. Guadagni, T. Rundek, and D. Lauro. Pharmacogenomics and pharmacogenetics of thiazolidinediones: role in diabetes and cardiovascular risk factors. *Pharmacogenomics* 15:2063–2082, 2014.
29. Depre, C., J. L. Vanoverschelde, and H. Taegtmeyer. Glucose for the heart. *Circulation* 99:578–588, 1999.
30. Devereux, R. B., M. J. Roman, M. Paranicas, M. J. O’Grady, E. T. Lee, T. K. Welty, R. R. Fabsitz, D. Robbins, E. R. Rhoades, and B. V. Howard. Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study. *Circulation* 101:2271–2276, 2000.
31. Dicker, D. DPP-4 inhibitors: impact on glycemic control and cardiovascular risk factors. *Diabetes Care* 34 Suppl 2:S276–278, 2011.
32. Díez, J. [Apoptosis in cardiovascular diseases]. *Rev. Esp. Cardiol.* 53:267–274, 2000.
33. Dobaczewski, M., J. J. de Haan, and N. G. Frangogiannis. The extracellular matrix modulates fibroblast phenotype and function in the infarcted myocardium. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 5:837–847, 2012.
34. D’Souza, A., F. C. Howarth, J. Yanni, H. Dobrynski, M. R. Boyett, E. Adeghate, K. R. Bidasee, and J. Singh. Left ventricle structural remodelling in the prediabetic Goto-Kakizaki rat. *Exp. Physiol.* 96:875–888, 2011.
35. Escudero, E. M., M. C. Camilión de Hurtado, N. G. Pérez, and A. L. Tufare. Echocardiographic assessment of left ventricular midwall mechanics in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Echocardiogr. J. Work. Group Echocardiogr. Eur. Soc. Cardiol.* 5:169–175, 2004.
36. Fang, Z. Y., J. B. Prins, and T. H. Marwick. Diabetic cardiomyopathy: evidence,

mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr. Rev.* 25:543–567, 2004.

37. Fan, S. C., B. C. Yu, Z. C. Chen, L. J. Chen, H. H. Chung, and J. T. Cheng. The decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptors delta (PPARdelta) is reversed by digoxin in the heart of diabetic rats. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* 42:637–642, 2010.

38. Federación Internacional de Diabetes. Atlas de la Diabetes de la FID. 2013.

39. Férez Santander, S. M., M. F. Márquez, M. A. Peña Duque, R. Ocaranza Sánchez, E. de la Peña Almaguer, and G. Eid Lidt. [Myocardial reperfusion injury]. *Rev. Esp. Cardiol.* 57 Suppl 1:9–21, 2004.

40. Di Filippo, C., S. Cuzzocrea, F. Rossi, R. Marfella, and M. D'Amico. Oxidative stress as the leading cause of acute myocardial infarction in diabetics. *Cardiovasc. Drug Rev.* 24:77–87, 2006.

41. Fiordaliso, F., B. Li, R. Latini, E. H. Sonnenblick, P. Anversa, A. Leri, and J. Kajstura. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats in angiotensin II- dependent. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 80:513–527, 2000.

42. Fischer, V. W., H. B. Barner, and L. S. Larose. Pathomorphologic aspects of muscular tissue in diabetes mellitus. *Hum. Pathol.* 15:1127–1136, 1984.

43. Frangogiannis, N. G. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb. Haemost.* 97:738–747, 2007.

44. Frustaci, A., J. Kajstura, C. Chimenti, I. Jakoniuk, A. Leri, A. Maseri, B. Nadal-Ginard, and P. Anversa. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ. Res.* 87:1123–1132, 2000.

45. Fujio, Y., T. Nguyen, D. Wencker, R. N. Kitsis, and K. Walsh. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 101:660–667, 2000.

46. Gaudron, P., C. Eilles, I. Kugler, and G. Ertl. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 87:755–763, 1993.

47. Geyer, H., G. Caracciolo, H. Abe, S. Wilansky, S. Carerj, F. Gentile, H.-J. Nesser, B. Khandheria, J. Narula, and P. P. Sengupta. Assessment of myocardial mechanics using speckle tracking echocardiography: fundamentals and clinical applications. *J. Am. Soc. Echocardiogr. Off. Publ. Am. Soc. Echocardiogr.* 23:351–369; quiz 453–455, 2010.

48. Gibbs, E. M., J. L. Stock, S. C. McCoid, H. A. Stukenbrok, J. E. Pessin, R. W. Stevenson, A. J. Milici, and J. D. McNeish. Glycemic improvement in diabetic db/db mice by overexpression of the human insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4). *J. Clin. Invest.* 95:1512–1518, 1995.

49. Göke, R., H. C. Fehmann, T. Linn, H. Schmidt, M. Krause, J. Eng, and B. Göke. Exendin-4

is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J. Biol. Chem.* 268:19650–19655, 1993.

50. Goldsmith, E. C., A. D. Bradshaw, M. R. Zile, and F. G. Spinale. Myocardial fibroblast-matrix interactions and potential therapeutic targets. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 70:92–99, 2014.

51. Gómez-Fernández, P. [Modulation of renin-angiotensin system for vascular protection in hypertensive patients and in patients with diabetic nephropathy]. *Rev. Clínica Esp.* 204:596–600, 2004.

52. Goodwin, G. W., C. S. Taylor, and H. Taegtmeyer. Regulation of energy metabolism of the heart during acute increase in heart work. *J. Biol. Chem.* 273:29530–29539, 1998.

53. Guo, L., and R. Tabrizchi. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. *Pharmacol. Ther.* 111:145–173, 2006.

54. Harris M, Zimmet P. Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. In: International Textbook of Diabetes Mellitus. 1997, pp. p9–23.

55. Heusch, G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet* 381:166–175, 2013.

56. Hickson-Bick, D. L. M., G. C. Sparagna, L. M. Buja, and J. B. McMillin. Palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes is not dependent on the generation of ROS. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282:H656–664, 2002.

57. Van Hoeven, K. H., and S. M. Factor. A comparison of the pathological spectrum of hypertensive, diabetic, and hypertensive-diabetic heart disease. *Circulation* 82:848–855, 1990.

58. Huang, X., and J. W. Walker. Myofilament anchoring of protein kinase C-epsilon in cardiac myocytes. *J. Cell Sci.* 117:1971–1978, 2004.

59. Hupe-Sodmann, K., G. P. McGregor, R. Bridenbaugh, R. Göke, B. Göke, H. Thole, B. Zimmermann, and K. Voigt. Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides. *Regul. Pept.* 58:149–156, 1995.

60. Ibanez, B., S. Prat-González, W. S. Speidl, G. Vilahur, A. Pinero, G. Cimmino, M. J. García, V. Fuster, J. Sanz, and J. J. Badimon. Early metoprolol administration before coronary reperfusion results in increased myocardial salvage: analysis of ischemic myocardium at risk using cardiac magnetic resonance. *Circulation* 115:2909–2916, 2007.

61. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Brussels, Belgium: 2013.

62. Inzucchi, S. E., R. M. Bergenstal, J. B. Buse, M. Diamant, E. Ferrannini, M. Nauck, A. L. Peters, A. Tsapas, R. Wender, D. R. Matthews, American Diabetes Association (ADA), and European Association for the Study of Diabetes (EASD). Management of hyperglycemia in

type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 35:1364–1379, 2012.

63. Ishibashi, Y., T. Matsui, M. Takeuchi, and S. Yamagishi. Sitagliptin augments protective effects of GLP-1 against advanced glycation end product receptor axis in endothelial cells. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* 43:731–734, 2011.

64. Ismail-Beigi, F., T. Craven, M. Banerji, J. Basile, J. Calles, R. Cohen, R. Cuddihy, W. C. Cushman, S. Genuth, R. H. Grimm, B. Hamilton, B. Hoogwerf, D. Karl, L. Katz, A. Krikorian, P. O'Connor, R. Pop-Busui, U. Schubart, D. Simmons, H. Taylor, A. Thomas, D. Weiss, and I. Hramiak. Effect of intensive treatment of hyperglycemia on microvascular complications of type 2 diabetes in ACCORD: a randomized trial. *Lancet* 376:419–430, 2010.

65. Kanda, H., and M. Miura. Regulatory roles of JNK in programmed cell death. *J. Biochem. (Tokyo)* 136:1–6, 2004.

66. Kawaguchi, M., M. Techigawara, T. Ishihata, T. Asakura, F. Saito, K. Maehara, and Y. Maruyama. A comparison of ultrastructural changes on endomyocardial biopsy specimens obtained from patients with diabetes mellitus with and without hypertension. *Heart Vessels* 12:267–274, 1997.

67. Keeley, E. C., J. A. Boura, and C. L. Grines. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* 361:13–20, 2003.

68. Knowlton, A. A., S. Kapadia, G. Torre-Amione, J. B. Durand, R. Bies, J. Young, and D. L. Mann. Differential expression of heat shock proteins in normal and failing human hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:811–818, 1998.

69. Knudsen, L. B., and L. Pridal. Glucagon-like peptide-1-(9-36) amide is a major metabolite of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide after in vivo administration to dogs, and it acts as an antagonist on the pancreatic receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 318:429–435, 1996.

70. Kolterman, O. G., D. D. Kim, L. Shen, J. A. Ruggles, L. L. Nielsen, M. S. Fineman, and A. D. Baron. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of exenatide in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Health-Syst. Pharm. AJHP Off. J. Am. Soc. Health-Syst. Pharm.* 62:173–181, 2005.

71. Lang, R. M., M. Bierig, R. B. Devereux, F. A. Flachskampf, E. Foster, P. A. Pellikka, M. H. Picard, M. J. Roman, J. Seward, J. S. Shanewise, S. D. Solomon, K. T. Spencer, M. S. J. Sutton, W. J. Stewart, Chamber Quantification Writing Group, American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee, and European Association of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J. Am. Soc. Echocardiogr.*

Off. Publ. Am. Soc. Echocardiogr. 18:1440–1463, 2005.

72. Leask, A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGF β , angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ. Res.* 106:1675–1680, 2010.

73. Letonja, M., and D. Petrovič. Is diabetic cardiomyopathy a specific entity? *World J. Cardiol.* 6:8–13, 2014.

74. Lexis, C. P. H., I. C. C. van der Horst, E. Lipsic, W. G. Wieringa, R. A. de Boer, A. F. M. van den Heuvel, H. W. van der Werf, R. A. J. Schurer, G. Pundziute, E. S. Tan, W. Nieuwland, H. M. Willemsen, B. Dorhout, B. H. W. Molmans, A. N. A. van der Horst-Schrivers, B. H. R. Wolffenbuttel, G. J. ter Horst, A. C. van Rossum, J. G. P. Tijssen, H. L. Hillege, B. J. G. L. de Smet, P. van der Harst, D. J. van Veldhuisen, and GIPS-III Investigators. Effect of metformin on left ventricular function after acute myocardial infarction in patients without diabetes: the GIPS-III randomized clinical trial. *JAMA* 311:1526–1535, 2014.

75. Li, J., H. Zhu, E. Shen, L. Wan, J. M. O. Arnold, and T. Peng. Deficiency of rac1 blocks NADPH oxidase activation, inhibits endoplasmic reticulum stress, and reduces myocardial remodeling in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetes* 59:2033–2042, 2010.

76. Listenberger, L. L., D. S. Ory, and J. E. Schaffer. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 276:14890–14895, 2001.

77. Liu, J., Y. Liu, L. Chen, Y. Wang, and J. Li. Glucagon-Like Peptide-1 Analog Liraglutide Protects against Diabetic Cardiomyopathy by the Inhibition of the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *J. Diabetes Res.* 2013:630537, 2013.

78. Lønborg, J., H. Kelbæk, N. Vejstrup, H. E. Bøtker, W. Y. Kim, L. Holmvang, E. Jørgensen, S. Helqvist, K. Saunamäki, C. J. Terkelsen, M. M. Schoos, L. Køber, P. Clemmensen, M. Treiman, and T. Engstrøm. Exenatide reduces final infarct size in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction and short-duration of ischemia. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 5:288–295, 2012.

79. Lønborg, J., N. Vejstrup, H. Kelbæk, H. E. Bøtker, W. Y. Kim, A. B. Mathiasen, E. Jørgensen, S. Helqvist, K. Saunamäki, P. Clemmensen, L. Holmvang, L. Thuesen, L. R. Krusell, J. S. Jensen, L. Køber, M. Treiman, J. J. Holst, and T. Engstrøm. Exenatide reduces reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 33:1491–1499, 2012.

80. Lønborg, J., N. Vejstrup, H. Kelbæk, L. Nepper-Christensen, E. Jørgensen, S. Helqvist, L. Holmvang, K. Saunamäki, H. E. Bøtker, W. Y. Kim, P. Clemmensen, M. Treiman, and T. Engstrøm. Impact of acute hyperglycemia on myocardial infarct size, area at risk, and salvage in patients with STEMI and the association with exenatide treatment: results from a randomized study. *Diabetes* 63:2474–2485, 2014.

81. Lorenzo, O., B. Picatoste, S. Ares-Carrasco, E. Ramírez, J. Egido, and J. Tuñón. Potential role of nuclear factor κ B in diabetic cardiomyopathy. *Mediators Inflamm.* 2011:652097, 2011.

82. Lorenzo, O., E. Ramírez, B. Picatoste, J. Egido, and J. Tuñón. Alteration of energy substrates and ROS production in diabetic cardiomyopathy. *Mediators Inflamm.* 2013:461967, 2013.
83. Manning, B. D., and L. C. Cantley. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261–1274, 2007.
84. Martín, R., M. Miana, R. Jurado-López, E. Martínez-Martínez, N. Gómez-Hurtado, C. Delgado, M. V. Bartolomé, J. A. San Román, C. Cordova, V. Lahera, M. L. Nieto, and V. Cachafeiro. DIOL triterpenes block profibrotic effects of angiotensin II and protect from cardiac hypertrophy. *PloS One* 7:e41545, 2012.
85. Massagué, J. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67:753–791, 1998.
86. Massagué, J., S. Cheifetz, M. Laiho, D. A. Ralph, F. M. Weis, and A. Zentella. Transforming growth factor-beta. *Cancer Surv.* 12:81–103, 1992.
87. Mazumder, P. K., B. T. O'Neill, M. W. Roberts, J. Buchanan, U. J. Yun, R. C. Cooksey, S. Boudina, and E. D. Abel. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes* 53:2366–2374, 2004.
88. Mazzone, T. Intensive glucose lowering and cardiovascular disease prevention in diabetes: reconciling the recent clinical trial data. *Circulation* 122:2201–2211, 2010.
89. Meier, J. J., and M. A. Nauck. Is the diminished incretin effect in type 2 diabetes just an epi-phenomenon of impaired beta-cell function? *Diabetes* 59:1117–1125, 2010.
90. Mellitzer, G., and G. Gradwohl. Enteroendocrine cells and lipid absorption. *Curr. Opin. Lipidol.* 22:171–175, 2011.
91. Mells, J. E., P. P. Fu, S. Sharma, D. Olson, L. Cheng, J. A. Handy, N. K. Saxena, D. Sorescu, and F. A. Anania. Glp-1 analog, liraglutide, ameliorates hepatic steatosis and cardiac hypertrophy in C57BL/6J mice fed a Western diet. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302:G225–235, 2012.
92. Miki, T., S. Yuda, H. Kouzu, and T. Miura. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail. Rev.* 18:149–166, 2013.
93. Mizushige, K., L. Yao, T. Noma, H. Kiyomoto, Y. Yu, N. Hosomi, K. Ohmori, and H. Matsuo. Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. *Circulation* 101:899–907, 2000.
94. Mojsov, S., G. Heinrich, I. B. Wilson, M. Ravazzola, L. Orci, and J. F. Habener. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J. Biol. Chem.* 261:11880–11889, 1986.
95. Mojsov, S., G. C. Weir, and J. F. Habener. Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat

pancreas. *J. Clin. Invest.* 79:616–619, 1987.

96. Monceau, V., Y. Belikova, G. Kratassiouk, D. Charue, E. Camors, C. Communal, P. Trouvé, F. Russo-Marie, and D. Charlemagne. Externalization of endogenous annexin A5 participates in apoptosis of rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 64:496–506, 2004.

97. Montrose-Rafizadeh, C., H. Yang, B. D. Rodgers, A. Beday, L. A. Pritchette, and J. Eng. High potency antagonists of the pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor. *J. Biol. Chem.* 272:21201–21206, 1997.

98. Muscogiuri, G., A. Cignarelli, F. Giorgino, F. Prodrum, D. Santi, G. Tirabassi, G. Balercia, R. Modica, A. Faggiano, and A. Colao. GLP-1: benefits beyond pancreas. *J. Endocrinol. Invest.* , 2014.doi:10.1007/s40618-014-0137-y

99. Nikolaidis, L. A., D. Elahi, T. Hentosz, A. Doverspike, R. Huerbin, L. Zourelis, C. Stolarski, Y. Shen, and R. P. Shannon. Recombinant glucagon-like peptide-1 increases myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with pacing-induced dilated cardiomyopathy. *Circulation* 110:955–961, 2004.

100. Noyan-Ashraf, M. H., M. A. Momen, K. Ban, A.-M. Sadi, Y.-Q. Zhou, A. M. Riazi, L. L. Baggio, R. M. Henkelman, M. Husain, and D. J. Drucker. GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice. *Diabetes* 58:975–983, 2009.

101. Orskov, C., and J. J. Holst. Radio-immunoassays for glucagon-like peptides 1 and 2 (GLP-1 and GLP-2). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 47:165–174, 1987.

102. Ostenson, C.-G., and S. Efendic. Islet gene expression and function in type 2 diabetes; studies in the Goto-Kakizaki rat and humans. *Diabetes Obes. Metab.* 9 Suppl 2:180–186, 2007.

103. Ostrander, D. B., G. C. Sparagna, A. A. Amoscato, J. B. McMillin, and W. Dowhan. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276:38061–38067, 2001.

104. Palomer, X., D. Alvarez-Guardia, R. Rodríguez-Calvo, T. Coll, J. C. Laguna, M. M. Davidson, T. O. Chan, A. M. Feldman, and M. Vázquez-Carrera. TNF-alpha reduces PGC-1alpha expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovasc. Res.* 81:703–712, 2009.

105. Pérez-Pérez, R., F. J. Ortega-Delgado, E. García-Santos, J. A. López, E. Camafeita, W. Ricart, J.-M. Fernández-Real, and B. Peral. Differential proteomics of omental and subcutaneous adipose tissue reflects their unlike biochemical and metabolic properties. *J. Proteome Res.* 8:1682–1693, 2009.

106. Pfeffer, M. A., and E. Braunwald. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81:1161–1172, 1990.

107. Piot, C., P. Croisille, P. Staat, H. Thibault, G. Rioufol, N. Mewton, R. Elbelghiti, T. T. Cung, E. Bonnefoy, D. Angoulvant, C. Macia, F. Raczka, C. Sportouch, G. Gahide, G. Finet, X.

André-Fouët, D. Revel, G. Kirkorian, J.-P. Monassier, G. Derumeaux, and M. Ovize. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 359:473–481, 2008.

108. Preis, S. R., M. J. Pencina, S.-J. Hwang, R. B. D'Agostino, P. J. Savage, D. Levy, and C. S. Fox. Trends in cardiovascular disease risk factors in individuals with and without diabetes mellitus in the Framingham Heart Study. *Circulation* 120:212–220, 2009.

109. Randle, P. J., P. B. Garland, C. N. Hales, and E. A. Newsholme. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785–789, 1963.

110. Ravassa, S., J. Barba, I. Coma-Canella, A. Huerta, B. López, A. González, and J. Díez. The activity of circulating dipeptidyl peptidase-4 is associated with subclinical left ventricular dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc. Diabetol.* 12:143, 2013.

111. Ravassa, S., A. Zudaire, R. D. Carr, and J. Díez. Antiapoptotic effects of GLP-1 in murine HL-1 cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300:H1361–1372, 2011.

112. Ravassa, S., A. Zudaire, and J. Díez. Glucagon-like peptide 1 and cardiac cell survival. *Endocrinol. Nutr. Órgano Soc. Esp. Endocrinol. Nutr.* 59:561–569, 2012.

113. Roberts, C. S., D. Maclean, P. Maroko, and R. A. Kloner. Early and late remodeling of the left ventricle after acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 54:407–410, 1984.

114. Roger, V. L. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 125:e2–e220, 2012.

115. Romano, S., M. Di Mauro, S. Fratini, L. Guarracini, F. Guarracini, G. Poccia, and M. Penco. Early diagnosis of left ventricular diastolic dysfunction in diabetic patients: a possible role for natriuretic peptides. *Cardiovasc. Diabetol.* 9:89, 2010.

116. Rösen, P., and N. F. Wiernsperger. Metformin delays the manifestation of diabetes and vascular dysfunction in Goto-Kakizaki rats by reduction of mitochondrial oxidative stress. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 22:323–330, 2006.

117. Rubler, S., J. Dlugash, Y. Z. Yuceoglu, T. Kumral, A. W. Branwood, and A. Grishman. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 30:595–602, 1972.

118. Sadoshima, J., and S. Izumo. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu. Rev. Physiol.* 59:551–571, 1997.

119. Sadoshima, J., L. Jahn, T. Takahashi, T. J. Kulik, and S. Izumo. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 267:10551–10560, 1992.

120. San Román, J. A., J. Candell-Riera, R. Arnold, P. L. Sánchez, S. Aguadé-Bruix, J. Bermejo, A. Revilla, A. Villa, H. Cuéllar, C. Hernández, and F. Fernández-Avilés. Quantitative analysis of

left ventricular function as a tool in clinical research. Theoretical basis and methodology. *Rev. Esp. Cardiol.* 62:535–551, 2009.

121. Simonsen, L., J. J. Holst, and C. F. Deacon. Exendin-4, but not glucagon-like peptide-1, is cleared exclusively by glomerular filtration in anaesthetised pigs. *Diabetologia* 49:706–712, 2006.

122. Sivertsen, J., J. Rosenmeier, J. J. Holst, and T. Vilsbøll. The effect of glucagon-like peptide 1 on cardiovascular risk. *Nat. Rev. Cardiol.* 9:209–222, 2012.

123. Stamler, J., O. Vaccaro, J. D. Neaton, and D. Wentworth. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 16:434–444, 1993.

124. St John Sutton, M., D. Lee, J. L. Rouleau, S. Goldman, T. Plappert, E. Braunwald, and M. A. Pfeffer. Left ventricular remodeling and ventricular arrhythmias after myocardial infarction. *Circulation* 107:2577–2582, 2003.

125. St John Sutton, M., M. A. Pfeffer, T. Plappert, J. L. Rouleau, L. A. Moyé, G. R. Dagenais, G. A. Lamas, M. Klein, B. Sussex, and S. Goldman. Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. The protective effects of captopril. *Circulation* 89:68–75, 1994.

126. Strutz, F., H. Okada, C. W. Lo, T. Danoff, R. L. Carone, J. E. Tomaszewski, and E. G. Neilson. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J. Cell Biol.* 130:393–405, 1995.

127. Sun, D., N. Nguyen, T. R. DeGrado, M. Schwaiger, and F. C. Brosius. Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. *Circulation* 89:793–798, 1994.

128. Taegtmeyer, H., R. Hems, and H. A. Krebs. Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart. *Biochem. J.* 186:701–711, 1980.

129. Tanaka, T., J. Yamamoto, S. Iwasaki, H. Asaba, H. Hamura, Y. Ikeda, M. Watanabe, K. Magoori, R. X. Ioka, K. Tachibana, Y. Watanabe, Y. Uchiyama, K. Sumi, H. Iguchi, S. Ito, T. Doi, T. Hamakubo, M. Naito, J. Auwerx, M. Yanagisawa, T. Kodama, and J. Sakai. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:15924–15929, 2003.

130. Thiemermann, C. Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and heart failure. *Br. J. Pharmacol.* 141:1–3, 2004.

131. Thorens, B., A. Porret, L. Bühler, S. P. Deng, P. Morel, and C. Widmann. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* 42:1678–1682, 1993.

132. Tian, X.-F., M.-X. Cui, S.-W. Yang, Y.-J. Zhou, and D.-Y. Hu. Cell death, dysglycemia and

myocardial infarction. *Biomed. Rep.* 1:341–346, 2013.

133. Timmers, L., J. P. S. Henriques, D. P. V. de Kleijn, J. H. Devries, H. Kemperman, P. Steendijk, C. W. J. Verlaan, M. Kerver, J. J. Piek, P. A. Doevendans, G. Pasterkamp, and I. E. Hoefer. Exenatide reduces infarct size and improves cardiac function in a porcine model of ischemia and reperfusion injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* 53:501–510, 2009.

134. Tomas, E., and J. F. Habener. Insulin-like actions of glucagon-like peptide-1: a dual receptor hypothesis. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 21:59–67, 2010.

135. Tomlinson, D. R., G. B. Willars, and A. L. Carrington. Aldose reductase inhibitors and diabetic complications. *Pharmacol. Ther.* 54:151–194, 1992.

136. tores/Miembros del Grupo de Trabajo *et al.* Grupo de Trabajo para el manejo del infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC). *Rev. Esp. Cardiol. Engl. Ed* 66:53.e1–53.e46, 2013.

137. Vahl, T. P., B. W. Paty, B. D. Fuller, R. L. Pigeon, and D. A. D'Alessio. Effects of GLP-1-(7-36)NH₂, GLP-1-(7-37), and GLP-1-(9-36)NH₂ on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:1772–1779, 2003.

138. Vassort, G., and B. Turan. Protective role of antioxidants in diabetes-induced cardiac dysfunction. *Cardiovasc. Toxicol.* 10:73–86, 2010.

139. Vaulont, S., M. Vasseur-Cognet, and A. Kahn. Glucose regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* 275:31555–31558, 2000.

140. Verma, S., and J. H. McNeill. Metformin improves cardiac function in isolated streptozotocin-diabetic rat hearts. *Am. J. Physiol.* 266:H714–719, 1994.

141. Verrecchia, F., and A. Mauviel. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J. Gastroenterol. WJG* 13:3056–3062, 2007.

142. Vilar-Rojas, C., A. M. Guzman-Grenfell, and J. J. Hicks. Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. *Arch. Med. Res.* 27:1–6, 1996.

143. Wagner, K.-D., and N. Wagner. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions. *Pharmacol. Ther.* 125:423–435, 2010.

144. Wagner, N., C. Jehl-Piéttri, P. Lopez, J. Murdaca, C. Giordano, C. Schwartz, P. Gounon, S. N. Hatem, P. Grimaldi, and K.-D. Wagner. Peroxisome proliferator-activated receptor beta stimulation induces rapid cardiac growth and angiogenesis via direct activation of calcineurin. *Cardiovasc. Res.* 83:61–71, 2009.

145. Wang, Y., and L. Cai. Diabetes/obesity-related inflammation, cardiac cell death and cardiomyopathy. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 31:814–818, 2006.

146. Watanabe, K., H. Fujii, T. Takahashi, M. Kodama, Y. Aizawa, Y. Ohta, T. Ono, G. Hasegawa, M. Naito, T. Nakajima, Y. Kamijo, F. J. Gonzalez, and T. Aoyama. Constitutive

regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha associated with age-dependent cardiac toxicity. *J. Biol. Chem.* 275:22293–22299, 2000.

147. Weber, K. T., C. G. Brilla, S. E. Campbell, G. Zhou, L. Matsubara, and E. Guarda. Pathologic hypertrophy with fibrosis: the structural basis for myocardial failure. *Blood Press.* 1:75–85, 1992.

148. Westermann, D., S. Van Linthout, S. Dhayat, N. Dhayat, F. Escher, C. Bücker-Gärtner, F. Spillmann, M. Noutsias, A. Riad, H.-P. Schultheiss, and C. Tschöpe. Cardioprotective and anti-inflammatory effects of interleukin converting enzyme inhibition in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 56:1834–1841, 2007.

149. Westermann, D., S. Rutschow, S. Jäger, A. Linderer, S. Anker, A. Riad, T. Unger, H.-P. Schultheiss, M. Pauschinger, and C. Tschöpe. Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. *Diabetes* 56:641–646, 2007.

150. Whelan, R. S., V. Kaplinskiy, and R. N. Kitsis. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu. Rev. Physiol.* 72:19–44, 2010.

151. Wu, L., and R. Derynck. Essential role of TGF-beta signaling in glucose-induced cell hypertrophy. *Dev. Cell* 17:35–48, 2009.

152. Wu, T., L. G. Trahair, M. J. Bound, C. F. Deacon, M. Horowitz, C. K. Rayner, and K. L. Jones. Effects of sitagliptin on blood pressure and heart rate in response to intraduodenal glucose infusion in patients with Type 2 diabetes: a potential role for glucose-dependent insulinotropic polypeptide? *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* , 2014.doi:10.1111/dme.12622

153. Xu, J., G. Wang, Y. Wang, Q. Liu, W. Xu, Y. Tan, and L. Cai. Diabetes- and angiotensin II-induced cardiac endoplasmic reticulum stress and cell death: metallothionein protection. *J. Cell. Mol. Med.* 13:1499–1512, 2009.

154. Yang, B., K. K. Brown, L. Chen, K. M. Carrick, L. G. Clifton, J. A. McNulty, D. A. Winegar, J. C. Strum, S. A. Stimpson, and G. L. Pahl. Serum adiponectin as a biomarker for in vivo PPARgamma activation and PPARgamma agonist-induced efficacy on insulin sensitization/lipid lowering in rats. *BMC Pharmacol.* 4:23, 2004.

155. Yan, W., H. Zhang, P. Liu, H. Wang, J. Liu, C. Gao, Y. Liu, K. Lian, L. Yang, L. Sun, Y. Guo, L. Zhang, L. Dong, W. B. Lau, E. Gao, F. Gao, L. Xiong, H. Wang, Y. Qu, and L. Tao. Impaired mitochondrial biogenesis due to dysfunctional adiponectin-AMPK-PGC-1 α signaling contributing to increased vulnerability in diabetic heart. *Basic Res. Cardiol.* 108:329, 2013.

156. Ye, Y., K. T. Keyes, C. Zhang, J. R. Perez-Polo, Y. Lin, and Y. Birnbaum. The myocardial infarct size-limiting effect of sitagliptin is PKA-dependent, whereas the protective effect of pioglitazone is partially dependent on PKA. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298:H1454–1465, 2010.

157. Young, M. E., P. McNulty, and H. Taegtmeyer. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: potential mechanisms. *Circulation* 105:1861–1870, 2002.
158. Zapatero Gaviria, A., R. Barba Martín, J. Canora Lebrato, J. E. Losa García, S. Plaza Canteli, J. Marco Martínez, and Grupo de Gestión Clínica de la Sociedad Española de Medicina Interna. [Mortality in internal medicine departments]. *Med. Clínica* 134:6–12, 2010.
159. Zhang, H., R. Pi, R. Li, P. Wang, F. Tang, S. Zhou, J. Gao, J. Jiang, S. Chen, and P. Liu. PPARbeta/delta activation inhibits angiotensin II-induced collagen type I expression in rat cardiac fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 460:25–32, 2007.
160. Zhao, H., R. Wei, L. Wang, Q. Tian, M. Tao, J. Ke, Y. Liu, W. Hou, L. Zhang, J. Yang, and T. Hong. Activation of glucagon-like peptide-1 receptor inhibits growth and promotes apoptosis of human pancreatic cancer cells in a cAMP-dependent manner. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306:E1431–1441, 2014.
161. Zijlstra, F., J. C. Hoorntje, M. J. de Boer, S. Reiffers, K. Miedema, J. P. Ottervanger, A. W. van 't Hof, and H. Suryapranata. Long-term benefit of primary angioplasty as compared with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 341:1413–1419, 1999.

8. Anexo A

Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados parcialmente en:

Artículos originales y revisiones:

1. Fuentes-Antrás J, PICATOSTE B, Ramírez E, Egido J, Tuñón J, Lorenzo O. Targeting Metabolic Disturbance in the Diabetic Heart. *Cardiovascular Diabetology*. 2015.
2. Santos-Gallego CG, PICATOSTE B, Badimon J. Pathophysiology of acute coronary síndrome. *Current Atherosclerosis Reports Curr Atheroscler Rep*. 2014 Apr;16(4):401. PMID: 24504549.
3. Lorenzo O, Ramírez E, PICATOSTE B, Egido J, Tuñón J. Alteration of Energy Substrates and ROS Production in Diabetic Cardiomyopathy. *Mediators Inflamm*. 2013; 461967. doi: 10.1155/2013/461967. Epub 2013 Oct 31. PMID: 24288443.
4. Ramírez E, Klett-Mingo M, Ares-Carrasco S, PICATOSTE B, Ferrarini A, Rupérez FJ, Caro-Vadillo A, Barbas C, Egido J, Tuñón J, Lorenzo Ó. Eplerenone attenuated cardiac steatosis, apoptosis and diastolic dysfunction in experimental type-II diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2013 Nov 21;12:172. PMID: 24261558
5. Santos-Gallego C, PICATOSTE B, Badimon J. Cholesterol HDL en la Aterotrombosis: Terapia farmacológica. Actual y futura. *Lipidología presente y futuro. Del Metabolismo y la biología vascular a la práctica clínica*. Ediciones Médicas del Sur. ISBN 978-987-260836-1. 2013.
6. PICATOSTE B, Ramírez E, Caro-Vadillo A, Iborra I, Egido J, José Tuñón, Lorenzo O. Sitagliptin Reduces Cardiac Apoptosis, Hypertrophy and Fibrosis Primarily by Insulin-Dependent Mechanisms in Experimental type-II Diabetes. Potential Roles of GLP-1 Isoforms. *Plos One*. 2013 October 2013 Oct 21;8(10); PMID: 24302978
7. Lorenzo O, PICATOSTE B, Ares-Carrasco S, Ramírez E, Egido J, Tuñón J. Potential role of nuclear factor κ B in diabetic cardiomyopathy. *Mediators Inflamm*. 2011;2011:652097. Epub 2011 May 3. PMID: 21772665.
8. Ares-Carrasco S*, PICATOSTE B*, Camafeita E, Carrasco-Navarro S, Zubiri I, Ortiz A, Egido J, López JA, Tuñón J, Lorenzo O. Proteome changes in the myocardium of experimental chronic diabetes and hypertension: role of PPAR α in the associated hypertrophy. *J. Proteomics*. 2012 Mar 16;75(6):1816-29. Epub 2011 Dec 30. PMID: 22234359. *equal contribution.
9. Ares-Carrasco S, PICATOSTE B, Benito-Martín A, Zubiri I, Sanz AB, Sánchez-Niño MD, Ortiz A, Egido J, Tuñón J, Lorenzo O. Myocardial fibrosis and apoptosis, but not inflammation, are present in long-term experimental diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Dec;297(6):H2109-19. Epub 2009 Oct 9. PMID:19820199.

Trabajos en fase de publicación:

10. Vahl TP, Santos-Gallego C, PICATOSTE B, Arias T, Ishikawa K, Torrente M, Ares-Carrasco S, Tilemann L, Sanz J, GoldmanMartin, Sengupta P, Hajjar RJ, Fuster V, Badimon JJ. Glucagon-like Peptide-1 receptor activation promotes cardioprotection and reduces left ventricular remodeling in a porcine model of ischemia and reperfusion. JACC (en revisión).
11. Santos-Gallego C, Vahl TP, Goliasch G, PICATOSTE B, Arias T, Ishikawa K, Sanz J, Narula J, Sengupta P, Hajjar J, Fuster V, Badimon JJ. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist fingolimod increases myocardial salvage and decreases adverse post-infarction left ventricular remodeling in a porcine model of ischemia-reperfusion. Circulation (en revisión).

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de esta tesis:

- Benito-Martin A, Ucero AC, Izquierdo MC, Santamaria B, PICATOSTE B, Carrasco S., Lorenzo O, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. Endogenous NAMPT dampens chemokine expression and apoptotic responses in stressed tubular cells. Biochim Biophys Acta. 2014 Feb 1842(2):2293-303. Epub 2013 Nov 25. PMID: 24287278.
- Santos-Gallego C,G PICATOSTE B, Badimon J. Colesterol HDL en la Aterotrombosis: Terapia farmacológica. Actual y futura. Lipidología presente y futuro. Del Metabolismo y la biología vascular a la práctica clínica. Ediciones Médicas del Sur. ISBN 978-987-260836-1. 2013.
- Badimon J, Santos-Gallego C,G PICATOSTE B, Ruiz-Mori E. Prevención primaria en Enfermedad Cardiovascular. Riesgo y Prevención Cardiovascular. 978-612-00-1509-4. 2014.

Los resultados de esta tesis han sido parcialmente presentados en la siguientes reuniones científicas:

- Santos-Gallego CG, Vahl T, PICATOSTE B, Ishikawa K, Agüero J, Goliasch G, Sanz J, Hajjar R, Fuster V, Badimon J. Echocardiographical Assessment of Post-Reperfusion Wall Thickening Accurately Quantifies the Area at Risk: An Experimental Porcine Study Validated with Magnetic Resonance and Histology. Scientific Session of American College of Cardiology, Washington DC, USA. March 29-31, 2014
- Santos-Gallego CG, Lam J, Vahl T I, PICATOSTE B, Ramachandran S, Narula J, Sengupta P, Fuster V, Badimon J, Sanz J. Diffuse Interstitial Myocardial Fibrosis Detected by T1 Mapping is Increased in Patients With Heart Failure With Preserved

Ejection Fraction, and Correlates With Diastolic Dysfunction and Severity of Heart Failure. Sesiones científicas de la Sociedad Americana de Cardiología, Dallas, TX, USA. November 16-20, 2013. Comunicación Oral.

- Santos-Gallego CG, Arias T, Vahl T, Goliasch G, PICATOSTE B, Fuster V, Badimon J, Sanz J. La técnica de T1 mapping cuantifica la fibrosis miocárdica intersticial difusa y ofrece información complementaria en la insuficiencia cardiaca con fracción de eyección conservada. Sesiones científicas de la Sociedad Española de Cardiología (SEC). Valencia, España, Octubre 24-26, 2013. Comunicación Oral.
- PICATOSTE B, Ares- Carrasco S, Ramírez E, Caro-Vadillo A, Tuñón J y Lorenzo O. Efecto directo de la incretina GLP-1 sobre el corazón diabético. Sesiones científicas de la Sociedad Española de Cardiología (SEC). Valencia, España, Octubre 24-26, 2013. Comunicación Oral.
- PICATOSTE B, Ares.S, Ramírez.E, Caro-Vadillo A A, Iborra.C, Tuñón.J and Lorenzo O. Sitagliptin reduces myocardial fibrosis and hypertrophy and enhances PPAR δ activation in experimental Type-2 Diabetes. Congreso de la Sociedad Europea del Corazón (ESC), Paris, Francia, Agosto 27-31, 2011.
- Lorenzo O., PICATOSTE B., Ares-Carrasco S., Ramírez E., Camafeita E., López JA., Egidio J., Tuñón J. A proteomic approach to the long-term experimental hypertensive-diabetic myocardium. Congreso de la Asociación Europea para el estudio de la Diabetes (EASD), Estocolmo, Suecia, Octubre, 2010.
- PICATOSTE B, Ares-Carrasco S, Ramírez E, Egidio J, Caro A, Tuñón J, Lorenzo O. Sitagliptin Reduces Myocardial Fibrosis and Hypertrophy, Enhances Ppard Activation and Improves Diastolic Function In Experimental Type-2 Diabetes. Sesiones científicas de la Sociedad Americana del Corazón (AHA), Chicago, EE.UU, Noviembre, 2010.
- PICATOSTE B, Ares-Carrasco S, Ramírez E, Egidio J, Caro A, Tuñón J, Lorenzo O. Fibrosis e hipertrofia en el miocardio Diabético tipo-II experimental. Papel de la Sitagliptina. Sesiones científicas de la Sociedad Española de Cardiología (SEC). Valencia, España, October 24-26, 2013.
- PICATOSTE B, S. Ares, E. Ramírez, J. Egidio, J. Tuñón, O. Lorenzo. Fibrosis and hypertrophy in experimental type II Diabetic myocardium. Lipids, Inflammation and IR at the cross-roads of CVD. Grupo Europeo para el estudio de la Resistencia a la Insulina (RECAVA), Mallorca, Spain, June 2-4, 2010. Comunicación oral

9. Anexo B

